

# **Einfluss von Cyclodextrinen auf die okulare Verfügbarkeit von Antiglaukomatosa und Immunsuppressiva in vitro / in vivo**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Apothekerin

Sigrid Ursula Knapp-Ulrich

geboren am 29.03.1973

in Tübingen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Sigrid Keipert

2. Prof. Dr. Uwe Pleyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.04

## Abstract

Die Verwendung von Cyclodextrinen (CDen) als Hilfsstoffe zur topischen Anwendung in der Ophthalmologie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Hierbei steht die Verbesserung der Wasserlöslichkeit schwerlöslicher Arzneistoffe, die Modifizierung der Bioverfügbarkeit sowie die Verminderung okularer Reizungen im Vordergrund.

Diese Arbeit untersuchte die corneale In-vitro-Permeation von Betarezeptorenblockern (partiell mit Pilocarpin kombiniert) im Zusammenhang mit alpha-CD und den hydroxypropylierten (HP) alpha-, beta- bzw. gamma-CD-Derivaten. Der Zusatz von CDen führte teilweise zu einer signifikanten Veränderung der Permeationsparameter, verglichen mit denjenigen der CDfreien Lösungen.

Weiterhin wurden das schwerlösliche Prodrug Mycophenolatmofetil (MMF) und die aktive Wirksubstanz Mycophenolsäure (MPA) mit HP-beta-CD in Lösung gebracht und anschließend die Wirkstoffverteilung im Kaninchenauge in vivo bestimmt. Im Vergleich zu einer MMF-Suspension waren die MPA-Spiegel in Cornea und Kammerwasser nach 60 min für die HP-beta-CD-haltige MMF-Lösung deutlich erhöht.

Ferner wurden für die neuen, extrem schwer wasserlöslichen Selektiven Glucocorticoidrezeptoragonisten (SEGRA) – ZK 216771 und ZK 247756 – innovative Augentropfenformulierungen entwickelt. So wurde ZK 216771 mit Ethanol und HP-gamma-CD in Lösung gebracht und für ZK 247756 eine HP-gamma-CDhaltige Mikroemulsion entwickelt. In beiden Fällen war ein spezielles Herstellungsverfahren erforderlich. ZK 247756 konnte auf diese Weise nach Keratoplastik bei Ratten erfolgreich angewendet werden (signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe bzw. Vehikelgruppe).

Schlagworte:

Okulare Verfügbarkeit

Betablocker

Mycophenolatmofetil

Selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten

Cyclodextrine

## Abstract

In the past years, cyclodextrins (CDs) became more and more an important excipient for drug formulations. The main use of CDs in ophthalmic drug delivery is to increase the water solubility of lipophilic drugs, to modify drug bioavailability and to reduce ocular irritation.

In the present study, the corneal permeability of different betablockers (in part combined with pilocarpine) in the presence of alpha-CD and hydroxypropylated (HP) alpha-, beta- and gamma-CD was examined. Addition of CDs often led to significant changes in permeation parameters, compared to CD-free solutions.

The prodrug mycophenolate mofetil and its active drug mycophenolic acid (MPA) were solubilized by HP-beta-CD. The intraocular availability of these solutions was studied in the rabbit eye in vivo in comparison to a MMF-suspension. Applying MMF/HP-beta-CD-solution, the MPA level in cornea and aqueous humour (after 60 min) turned out to be significant higher than those of the MMF-suspension.

In addition, for the extremely low soluble selective glucocorticoidreceptor agonists (SEGRA) – ZK 216771 and ZK 247756 – innovative drug formulations were developed. ZK 216771 was solubilized with ethanol and HP-gamma-CD in buffer. A microemulsion, containing also HP-gamma-CD, served as vehicle for ZK 247756. For both formulations, a special manufacturing process was required. In this way, ZK 247756 could be applied in rabbits after corneal transplantation. Topical application of this formulation was highly effective in prolonging the mean survival time of corneal grafts as compared to untreated controls or animals that received the vehicle only.

Key words:

Ocular availability

Betablocker

Mycophenolate mofetil

Selektive Glucocorticoidreceptoragonists

Cyclodextrins

*Meiner Familie*

## DANKSAGUNG

Meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Sigrid Keipert danke ich für die Überlassung der Themen sowie die immer freundliche sowie kritische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Auch möchte ich mich bei ihr bedanken, dass sie mir ermöglicht hat, in Kooperation mit Klinik und Industrie zu arbeiten und an mehreren internationalen Kongressen teilzunehmen.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie danke ich herzlich für die erlebnisreiche und interessante Zeit der Promotion. Den (jetzt ehemaligen) Studenten Elena Vitkovsky und Marcel Wree sei für die tatkräftige Unterstützung bei einigen Versuchsreihen des 1. Teils der vorliegenden Arbeit gedankt. Auch gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Burkhard Siefert, dessen Arbeitsplatz ich übernehmen konnte, für die immer motivierende fachliche und außerfachliche Kommunikation in den letzten Jahren.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Pleyer (Abteilung für Augenheilkunde, Charité, Campus Virchow-Klinikum) für die sehr gute Kooperation und die wertvollen Diskussionen im Rahmen des Mycophenolatmofetil- sowie des SEGRA-Projekts. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei allen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und internationale Atmosphäre im Labor Ziegelstraße bedanken. Besonders danke ich Herrn Dr. Eckart Bertelmann für die produktive Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Wirkstoffverteilung am Kaninchenauge. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Agnes Porstmann und Herrn Maurice de Rujiter für die ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit bei allen tierexperimentellen Versuchen mit Ratten.

Frau Dr. Heike Schäcke und Herrn Dr. Norbert Schmees (Schering AG) danke ich sehr für die positive Kooperation und für interessante Diskussionen und Gespräche während des gemeinsamen SEGRA-Projekts.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Thorsteinn Loftsson, Herrn Prof. Dr. Már Másson und allen Mitarbeitern des Pharmazeutischen Instituts in Reykjavik, Island, die mich während meines Auslandsaufenthalts motiviert haben, mit Cyclodextrinen wissenschaftlich zu arbeiten. Mein besonderer Dank gilt Frau Johanna F. Sigurjónsdóttir und Hákon H. Sigurdsson.

Für die Hilfe bei technischen Problemen, die während der Erstellung dieser Arbeit aufgetreten sind, danke ich Frau Beate Rennert (Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie) und Herrn Dr. J. Luis Pérez Lustres (Institut für Chemie). In diesem Kontext seien auch Herr Dr. Jorge Carrazana-Garcia sowie Frau Dr. Carmen Gruber-Traub dankend erwähnt.

Außerdem möchte ich ganz besonders allen Erziehern der Kindertagesstätte Preußstraße für die ausgezeichnete Betreuung meiner Tochter während der letzten Phase der Promotion danken, insbesondere Frau Monika Matthes. Auch unserer Babysitterin Frau Dana Grüning sei herzlich gedankt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinen ehemaligen Kommilitonen für ihre eingehende, konstante Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Natürlich gilt mein größter Dank meinem Mann Frank sowie meiner Tochter Luisa Mara.

*On ne voit bien qu'avec le coeur.  
L'essentiel est invisible pour les yeux.  
(Antoine de Saint-Exupéry / Le Petit Prince)*

# INHALT

<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	<i>XIII</i>
<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Problemstellung</b> .....	<b>4</b>
<b>III. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
<b>III.1. Anatomie, Physiologie und Funktionalität des Auges</b> .....	<b>5</b>
III.1.1. Der Augapfel.....	5
III.1.2. Die Tränenflüssigkeit.....	7
III.1.3. Das Kammerwasser.....	9
III.1.4. Die Cornea .....	11
<b>III.2. Lokale Therapie in der Augenheilkunde</b> .....	<b>12</b>
III.2.1. Allgemeines .....	12
III.2.2. Glaukom.....	15
III.2.3. Immunologische Erkrankungen .....	19
<b>III.3. Arzneistoffe</b> .....	<b>23</b>
III.3.1. Pilocarpin .....	23
III.3.1.1. Eigenschaften .....	23
III.3.1.2. Pharmakologie .....	24
III.3.2. $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten .....	25
III.3.2.1. Struktur und Eigenschaften.....	25
III.3.2.2. Pharmakologie .....	28
III.3.3. Mycophenolatmofetil (MMF) und Mycophenolsäure (MPA) .....	33
III.3.3.1. Eigenschaften .....	33
III.3.3.2. Pharmakologie .....	34
III.3.4. ZK 216771 .....	36
III.3.5. ZK 247756 .....	37
<b>III.4. Hilfsstoffe/Trägersysteme</b> .....	<b>37</b>
III.4.1. Cyclodextrine .....	37
III.4.1.1. Cyclodextrine allgemein .....	38
III.4.1.2. Cyclodextrine in Ophthalmika .....	40
III.4.1.3. Toxikologie der Cyclodextrine .....	44



III.4.1.4. Mikroemulsionen.....	45
III.4.1.5. Sonstige Hilfsstoffe .....	46
III.4.1.5.1. Benzalkoniumchlorid .....	46
III.4.1.5.2. Rizinusöl.....	47
III.4.1.5.3. Polysorbat 80 (Tween® 80) .....	48
III.4.1.5.4. Cremophor® RH 40 .....	48
III.4.1.5.5. Macrogol 300/400 .....	49
<b>IV. Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
<b>IV.1. Löslichkeitsversuche.....</b>	<b>50</b>
<b>IV.2. Bestimmung der Arzneistoff/CD-Komplexierung.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.3. In-vitro-Permeationsstudien durch isolierte Schweinecornea .....</b>	<b>53</b>
IV.3.1. Theoretische Grundlagen.....	53
IV.3.1.1. In-vitro Modelle.....	53
IV.3.1.2. Flux.....	53
IV.3.1.3. Permeabilitätskoeffizient.....	54
IV.3.2. Versuchsdurchführung .....	55
<b>IV.4. In-vivo-Versuche (Kaninchen) .....</b>	<b>56</b>
<b>IV.5. In-vivo-Versuche (Ratte).....</b>	<b>57</b>
<b>V. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>58</b>
<b>V.1. Betarezeptorenblocker .....</b>	<b>58</b>
V.1.1. In-vitro-Permeation aus Pufferlösungen.....	59
V.1.2. In-vitro-Permeationsstudien aus Cyclodextrin-Formulierungen .....	62
V.1.2.1. Versuchsdurchführung .....	62
V.1.2.2. Mepindolol / $\alpha$ -Cyclodextrine .....	63
V.1.2.3. Mepindolol / HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD .....	67
V.1.2.4. Pindolol.....	71
V.1.2.5. Mepindolol / Pilocarpin-Kombinationen.....	72
V.1.2.6. Wechselwirkungen mit Cyclodextrinen .....	80
V.1.2.6.1. Pindolol .....	80
V.1.2.6.2. Mepindolol .....	83
V.1.3. Corneale Verträglichkeit.....	85
V.1.4. Kapitelzusammenfassung .....	89

<b>V.2. Mycophenolatmofetil (MMF) und Mycophenolsäure (MPA).....</b>	<b>91</b>
V.2.1. Intraokulare MMF / MPA-Verteilung.....	92
V.2.2. Vergleichende MMF- und MPA-Applikation.....	96
V.2.3. Mitreaktion des unbehandelten Auges.....	97
V.2.4. Resümee .....	99
V.2.5. Kapitelzusammenfassung.....	103
<b>V.3. Selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten .....</b>	<b>104</b>
V.3.1. ZK 216771 .....	104
V.3.1.1. Rezepturentwicklung .....	104
V.3.1.2. In-vitro-Permeation.....	106
V.3.2. ZK 247756 .....	108
V.3.2.1. Rezepturentwicklung .....	108
V.3.2.2. In-vitro-Permeation.....	111
V.3.2.3. In-vitro-Penetration.....	112
V.3.2.4. In-vivo-Studie nach Keratoplastik .....	113
V.3.3. Kapitelzusammenfassung.....	115
<b>VI. Material und Methoden .....</b>	<b>116</b>
<b>VI.1. Verwendete Substanzen.....</b>	<b>116</b>
<b>VI.2. Methoden .....</b>	<b>119</b>
VI.2.1. Physikalisch-chemische Methoden.....	119
VI.2.1.1. Viskosität .....	119
VI.2.1.2. Dichte .....	119
VI.2.1.3. Oberflächenspannung.....	120
VI.2.1.4. Osmolalität.....	120
VI.2.1.5. pH-Wert .....	120
VI.2.1.6. Leitfähigkeit.....	120
VI.2.1.7. Verteilungskoeffizient.....	120
VI.2.1.8. Partikeldurchmesser .....	121
VI.2.2. Gehaltsbestimmungen.....	122
VI.2.2.1. Pilocarpin-HCl .....	123
VI.2.2.2. Betablocker .....	123
VI.2.2.3. Mycophenolatmofetil / Mycophenolsäure .....	125
VI.2.2.4. ZK 216771 / ZK 247756.....	125

VI.2.2.5. Cyclodextrine .....	126
VI.2.3. Arzneistoff / Cyclodextrin-Komplexe .....	127
VI.2.3.1. Komplexherstellung .....	127
VI.2.3.2. Komplexcharakterisierung .....	127
VI.2.3.2.1. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) .....	127
VI.2.3.2.2. Röntgendiffraktometrie (X-RD) .....	128
VI.2.3.2.3. Löslichkeitsstudien .....	128
VI.2.4. Wirkstoffpermeation durch isolierte Schweinecornea .....	130
VI.2.4.1. Präparation der Cornea .....	130
VI.2.4.2. Permeationsapparatur .....	131
VI.2.4.3. Versuchsdesign .....	132
VI.2.4.4. Herstellung der Lösungen .....	133
VI.2.4.4.1. Arzneistofflösungen .....	133
VI.2.4.4.2. Cyclodextrinlösungen .....	135
VI.2.5. Wirkstoffpenetration in isolierte Schweinecornea .....	135
VI.2.6. Verteilung von Mycophenolatmofetil am Kaninchenauge .....	136
VI.2.6.1. Testlösungen .....	136
VI.2.6.2. Tierversuche (Kaninchen) .....	137
VI.2.6.3. Gewebeaufarbeitung .....	138
VI.2.6.3.1. Kammerwasser .....	138
VI.2.6.3.2. Cornea / Sclera .....	138
VI.2.6.3.3. Conjunctiva / Iris-Ziliarkörper .....	139
VI.2.6.3.4. Glaskörper / Plasma .....	139
VI.2.7. Herstellung okularer Formulierungen von ZK 216771 / 247756 .....	139
VI.2.7.1. ZK 216771 .....	139
VI.2.7.2. ZK 247756 .....	139
VI.2.7.3. Keratoplastik .....	140
VI.2.7.3.1. Tiere .....	140
VI.2.7.3.2. Tiermodell .....	141
VI.2.7.3.3. Chirurgie .....	141
VI.2.7.3.4. Topische Behandlung der Ratten .....	142
VI.2.7.3.5. Beurteilung der Transplantate .....	142
VI.2.7.3.6. Bestimmung der immunologischen Parameter .....	143
VI.2.8. Raster-Elektronenmikroskopie (REM) .....	143
VI.2.9. Statistik .....	145
VI.2.9.1. Betarezeptorenblocker / Mycophenolatmofetil .....	145

VI.2.9.2. SEGRA (Keratoplastik) .....	146
<b>VII. Zusammenfassung .....</b>	<b>147</b>
<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</i>	<i>152</i>
<i>Abbildungsverzeichnis .....</i>	<i>152</i>
<i>Tabellenverzeichnis .....</i>	<i>153</i>
<i>Literaturverzeichnis .....</i>	<i>155</i>
<i>Publikationen .....</i>	<i>171</i>
<i>Erklärung .....</i>	<i>173</i>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -CD	Alpha-Cyclodextrin
$\alpha$ -CD-Pol	Alpha-Cyclodextrin-Polymer
AUC	engl.: Area under the Curve
$\beta$ -CD	Beta-Cyclodextrin
BAC	Benzalkoniumchlorid
CM- $\alpha$ -CD-Pol	Carboxymethyliertes alpha-Cyclodextrin-Polymer
CD	Cyclodextrin
CD3	engl.: Cluster of Differentiation bzw. Cluster Determinants (internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen auf der Zelloberfläche von Leukozyten und Zellen, deren Zellmembranantigene mit denen von Immunzellen identisch sind)
CsA	Cyclosporin A
$c_s$	Sättigungskonzentration
DA	Rattenstamm
DM- $\beta$ -CD	Dimethyl-beta-Cyclodextrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dptr	1 Dioptrie = 1/ Brennweite
Eur. Ph.	Europäisches Arzneibuch
Schweinecornea <sup>E</sup>	Schweineaugen aus Eberswalde-Britz
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
$\gamma$ -CD	Gamma-Cyclodextrin
GC	Glucocorticoid(e)
GBR	Glutathion-Bicarbonat-Ringerlösung
HE- $\beta$ -CD	Hydroxyethyl-beta-Cyclodextrin
HET-CAM-Test	engl.: Hen's Egg Chorionallantoic Membrane Test
HLA	engl.: Human Leucocyte Antigen (System)
HLB	engl.: Hydrophilic Lipophilic Balance
HP- $\alpha$ -CD	Hydroxypropyl-alpha-Cyclodextrin
HP- $\beta$ -CD	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HP- $\gamma$ -CD	Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin
HPLC	engl.: High Performance/Pressure Liquid Chromatography
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma

IL	Interleukin
IOP	engl.: Intraocular Pressure
IUPAC	engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry
K <sub>Stab</sub>	Apparente Stabilitätskonstante
LEW	Lewis (Rattenstamm)
LP	Lyophilisat
M- $\beta$ -CD	Methyl-beta-Cyclodextrin
ME	Mikroemulsion
MEP	Mepindololsulfat
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	engl.: Mycophenolic acid (Mycophenolsäure)
M <sub>r</sub>	Relative Molekülmasse
n	Anzahl der Stichproben
OS	Oberflächenspannung [mN/m]
P <sub>app</sub>	Apparenter Permeabilitätskoeffizient (entspricht P <sub>eff</sub> )
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
P <sub>eff</sub>	Effektiver Permeabilitätskoeffizient
P	Pilocarpinhydrochlorid
PIN	Pindolol-Base
pK <sub>a</sub>	Aciditätskonstante
Q <sub>300</sub>	Kumulativ freigesetzte Arzneistoffmenge nach 300 min [%]
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RI	Brechungsindex
RT	Raumtemperatur (22 $\pm$ 0,5°C)
RM- $\beta$ -CD	engl.: Randomized-Methylated-beta-Cyclodextrin
SBE- $\beta$ -CD	Sulfobutylether-beta-Cyclodextrin
SD	engl.: Standard Deviation
SPP	Sørensen-Phosphat-Pufferlösung
Schweinecornea <sup>T</sup>	Schweineaugen aus Teltow
TBME	Tert-Butyl-Methyl-Ether
t <sub>lag</sub>	engl.: Lag time
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha

USP	United States Pharmacopoe (das US-amerikanische Arzneibuch)
$V_K$	Octanol-Verteilungskoeffizient
X-RD	Röntgendiffraktometrie





## I. EINLEITUNG

Erkrankungen am Auge werden in den meisten Fällen lokal behandelt. Nur im Ausnahmefall oder mangels Alternativen sollte eine systemische Therapie eingesetzt werden. Eine lokale Therapie wird z.B. durch die Anwendung von Augentropfen (sterile, wässrige bzw. ölige Lösungen oder Suspensionen), Augensalben oder -inserten [54] möglich. Nach wie vor stehen die wässrigen Augentropfen (*Guttae ophthalmicae*) im Vordergrund, da diese im Allgemeinen leicht anzuwenden sind und so zu einer hohen Compliance beim Patienten führen.

Ein Nachteil wässriger Augentropfen ist deren rascher Abtransport über den Tränen-Nasenkanal. Weiterhin kommt es durch den Reiz bei der Applikation wässriger Augentropfen häufig zur vermehrten Tränenproduktion und damit zur Steigerung der Drainagerate. Auf Grund dessen sind weniger als 10% des ursprünglich applizierten Arzneistoffs in der Lage, das Hornhautepithel zu durchdringen und einen therapeutischen Effekt im Auge zu entfalten. Bis zu 90% der Arzneistoffmenge können durch die conjunktivalen und nasalen Blutgefäße zur systemischen Zirkulation gelangen [100] und zu unerwünschten Effekten führen.

Um systemische Nebenwirkungen zu minimieren, gibt es eine Reihe galenischer Maßnahmen. Eine Möglichkeit bietet die Vehikelzusammensetzung, die so gewählt werden kann, dass eine längere präcorneale Verweildauer des Arzneistoffs resultiert, beispielsweise durch Viskositätserhöhung mittels Makromolekülen [155, 156]. Ein anderer Aspekt ist die Variation von Formulierungsparametern, wie Tonizität, pH-Wert oder Zusatz von Konservierungsmitteln und weiteren Hilfsstoffen, was sich entscheidend auf die lokale und/oder systemische Resorption auswirken kann [100].

In dieser Arbeit werden neuartige, vorwiegend wässrige Augentropfen mit dem Ziel entwickelt, am Auge gut verträglich zu sein und die Bioverfügbarkeit bzw. die Verfügbarkeit am Auge zu optimieren. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht der Einsatz von Cyclodextrinen (CDen) als potentielle ophthalmologische Hilfsstoffe.

Hinsichtlich der Wirkstoffe werden die *In-vitro*-Permeation von hydrophilen Arzneistoffen (Betablocker, Pilocarpin-HCl (P)) sowie die *In-vitro/In-vivo*-Permeation bzw. die okuläre Verfügbarkeit der lipophilen Immunsuppressiva (Mycophenolatmofetil (MMF)/Mycophenolsäure (MPA)) und der neuen, selektiven Glucocorticoidrezeptoragonisten (SEGRA) – ZK 216771 und ZK 247756 – getestet.

Topisch angewendete  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten ( $\beta$ -Blocker) sind heute zumeist das Mittel der Wahl in der medikamentösen Behandlung des Glaukoms (Grüner Star). Diese Wirkstoffe reduzieren den Intraokularen Druck (IOP), wodurch bei schnell einsetzender Therapie eine Schädigung des Sehnervs, gefolgt von möglichem Sehverlust, zu verhindern ist [250].

Obwohl die  $\beta$ -Blocker am Auge in relativ niedrigen Konzentrationen topisch appliziert werden, kann in hohem Maße eine systemische Resorption erfolgen und zu unerwünschten kardiovaskulären und/oder pulmonalen Nebenwirkungen führen. So wird bei prädisponierten Patienten sogar Herzversagen beschrieben [230].

Durch gezielte galenische Formulierung lassen sich die Kontaktzeit am Auge verlängern, die Applikationsfrequenz verringern und ggf. der Arzneistoffgehalt im Ophthalmikum weiter reduzieren. Ferner stellen die Verwendung von  $\beta$ -Blockern mit partieller agonistischer Aktivität oder die kombinierte Anwendung mit Pilocarpinhydrochlorid (P) weitere Alternativen zur Therapieverbesserung einer Glaukomerkrankung dar.

In unserer Arbeitsgruppe wurden wässrige Formulierungen mit Viskositäts erhöhern, wie Cellulosederivate, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol oder Polyacrylsäure entwickelt [76, 103, 155, 156]. Höherviskose Augentropfen sind in der Lage, die Verweildauer am Auge zu verlängern und damit die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs zu steigern. Eine neuere Studie zeigt eine verlängerte Wirkdauer einer Kombination von Timolol mit P durch den Zusatz von hyaluronsauren Salzen [26]. Ein anderes hilfstoffdeterminiertes Prinzip besteht in der Verwendung von CDen. Durch Inklusion, insbesondere hydrophiler, ophthalmologisch relevanter Wirkstoffe, in die CD-Kavität kann ein Retardeffekt am Auge, ohne Viskositäts-erhöhung, resultieren [101]. Dieses Postulat war für ausgewählte  $\beta$ -Blocker und CD-Derivate zunächst in *In-vitro*-Studien zu überprüfen.

Ein weiteres wichtiges ophthalmologisches Feld ist der Einsatz von Immunsuppressiva und antiinflammatorischen Substanzen als medikamentöse Therapie nach Hornhauttransplantation (Keratoplastik), eine der am häufigsten durchgeführten Transplantationen. In Deutschland erfolgen 3000 bis 4000 Hornhauttransplantationen pro Jahr, in den Vereinigten Staaten von Amerika 40000 bis 50000. Allerdings stellen Immunreaktionen immer noch ein schwerwiegendes Problem in der postoperativen Phase dar, vor allem in Risikosituationen [18, 161]. Diese Immunreaktionen limitieren die Transplantatüberlebensrate. Normalerweise

werden den Patienten in diesen Risikosituationen Immunsuppressiva systemisch verabreicht. Als Mittel der Wahl dient bisher Cyclosporin A (CsA) [97, 162]. Das hoch wirksame CsA kann jedoch bei vielen Patienten zahlreiche, z.T. schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen.

In den letzten Jahren wurde Mycophenolatmofetil (MMF) als erfolgreiche medikamentöse Alternative eingesetzt, die im Vergleich zu CsA weniger Nebenwirkungen hervorruft [178, 181]. Die Wirksamkeit von MMF konnte sowohl an einem cornealen Transplantat-abstoßungsmodell der Maus [180] als auch bei Hochrisikokeratoplastik [178, 181] gezeigt werden. Parallel laufen Studien, die den Nutzen von systemisch angewendetem MMF bei Immunerkrankungen, wie dem okulären Pemphigoid oder der Uveitis, einschätzen [249, 252]. Vorläufige Ergebnisse lassen einen positiven Effekt bei diesen Patienten vermuten. Jedoch werden auch von MMF bei systemischer Verabreichung eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen beschrieben [109, 205]. Folglich sollte eine topische Anwendung am Auge in Betracht gezogen werden, um auf diese Weise unerwünschte Effekte zu reduzieren.

Eine weitere Möglichkeit zur immunmodulierenden Therapie stellen die neu entwickelten SEGRA dar, die eine gute Alternative zu den sehr häufig angewendeten Glucocorticoiden (GC) darstellen, da sie möglicherweise ein bedeutend geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Auch für diese Substanzen ist eine topische Anwendung am Auge wünschenswert.

## II. PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich vorrangig mit der Anwendung von Cyclodextrinen (CDen) in Ophthalmika. Im Vordergrund standen die Modifizierung der Arzneistoff-permeation bzw. -penetration *in vitro* sowie partiell die okulare Arzneistoffverfügbarkeit *in vivo*. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Arzneistoffe untersucht, die sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften teilweise grundlegend unterscheiden und unterschiedlichen Wirkstoffklassen angehören.

Ausgewählte, strukturell ähnliche Betarezeptorenblockerpaare (Pindolol/Mepindolol; Metoprolol/Betaxolol; Alprenolol/Oxprenolol) waren zunächst hinsichtlich ihrer *In-vitro*-Permeabilität durch isolierte Schweinecornea zu vergleichen. Beispielhaft sollte nachfolgend der Einfluss von ausgewählten CDen ( $\alpha$ -CD, Hydroxypropyl(HP)- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD) auf ihr Permeationsverhalten evaluiert werden. Von besonderem Interesse war die Kombination eines  $\beta$ -Blockers – mit und ohne Zusatz nativer und hydroxypropylierter CDe – mit Pilocarpinhydrochlorid (P), wofür das hydrophile Mepindololsulfat (MEP) ausgewählt wurde. Für die relativ lipophile Pindolol-Base (PIN) dienten CDe als Lösungsvermittler, um anschließend die Permeation durch Schweinecornea zu ermöglichen. Zur Untersuchung auftretender  $\beta$ -Blocker-CD-Wechselwirkungen sollten Löslichkeitsstudien, Röntgen-diffraktometrie (X-RD) und Infrarotspektroskopie (FT-IR) herangezogen werden.

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit bestand darin, die okulare Verteilung des lipophilen Prodrugs Mycophenolatmofetil (MMF) am Kaninchen *in vivo* zu ermitteln. Voraussetzung hierfür war die Entwicklung einer löslichen Formulierung, was in einer Vorläuferarbeit [202, 203] durch Verarbeitung mit HP- $\beta$ -CD gelang, sodass letztere mit einer MMF-Suspension sowie mit der aktiven Wirksubstanz Mycophenolsäure (MPA) verglichen werden konnte. Die Wirkstofferrfassung war nach 30, 60 und 240 min in Cornea, Sclera, Conjunctiva, Iris-Ziliarkörper, Kammerwasser sowie im Plasma der Testtiere vorgesehen.

Weiterhin sollten die neuen, sehr schwer wasserlöslichen Selektiven Glucocorticoidrezeptor-agonisten (SEGRA) ZK 216771 und ZK 247756, die sich in der pharmakologischen Testung von SCHERING befinden, in eine geeignete galenische Formulierung zur okularen Anwendung gebracht und anschließend an Ratten nach Keratoplastik getestet werden.

### III. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

#### III.1. Anatomie, Physiologie und Funktionalität des Auges

##### III.1.1. Der Augapfel

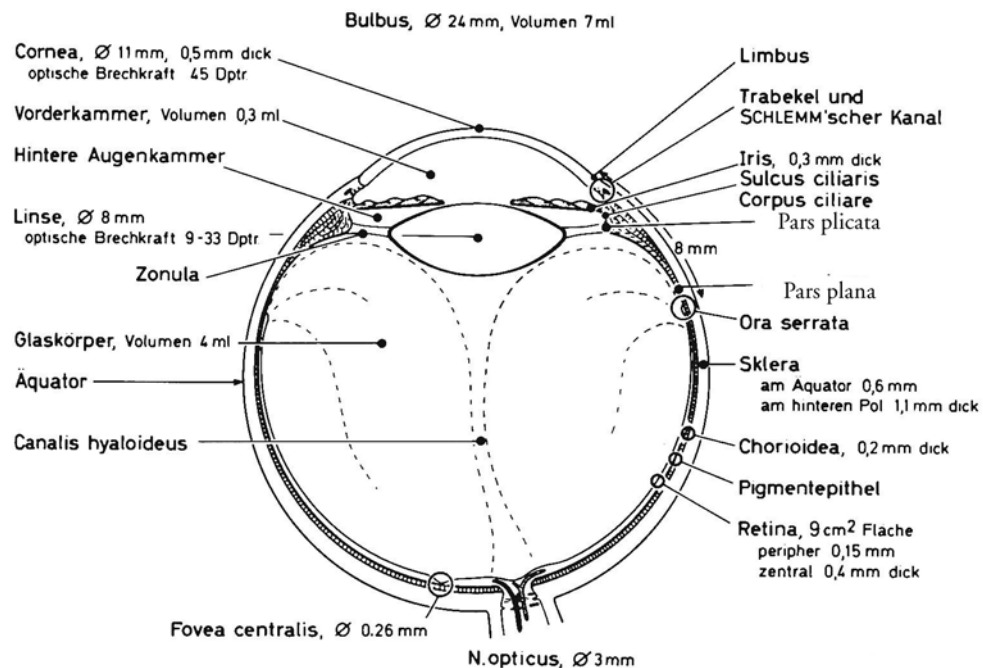


Abb. 1: Schnitt durch den Augapfel; nach [177]

Der *Bulbus oculi* (*Augapfel*) hat annähernd die Form einer Kugel. Die *Sclera* (*Lederhaut*) bildet seine feste äußere Hülle. Vorn befindet sich ein größeres rundliches Fenster, in das die gewölbte, klare *Cornea* (*Hornhaut*) eingepasst ist. An der Rückseite des Augapfels verlaufen die Nervenfasern aus der *Retina* (*Netzhaut*) durch die *Lamina cribrosa*, eine siebartige Öffnung, und vereinigen sich dann zu einem dicken Strang, dem *Nervus opticus* (*Sehnerv*) [177].

Die Durahülle des Nervus opticus geht kontinuierlich in die Sclera über. Am Übergang von Sclera zu Cornea befindet sich das Trabekelwerk. Die Sclera verfügt über ein eigenes Blutkreislaufsystem, das bei Entzündungen subconjunctival rötlich durchschimmert.

Der Raum zwischen der vorderen Glaskörpergrenzmembran und der Rückseite der Iris wird als *hintere*, derjenige zwischen Iris und Hornhaut als *vordere Augenkammer* bezeichnet. Beide Räume sind mit klarem Kammerwasser gefüllt, das durch die Pupille von der

Hinterkammer in die Vorderkammer fließt [177].

Das transparente Gewebe der Cornea ist frei von Blutgefäßen und weicht damit im Bau, im Stoffwechsel und in der Physiologie von vaskularisierten Organen ab. Die Krümmung der Hornhaut und ihre glatte, optisch brechende Oberfläche stellen einen Teil des optischen Systems des Auges dar. Die Cornea wölbt sich über der *Iris (Regenbogenhaut)* und der Vorderkammer kuppelartig hervor. An ihrem Rand, dem *Limbus corneae*, steht sie mit der Sclera und der *Conjunctiva (Bindehaut)* in Verbindung. Der Hornhautdurchmesser beträgt bei Erwachsenen 11-12 mm, die Dicke 0,45-0,55 mm [177].

Da die Cornea in dieser Arbeit sowohl als Permeationsbarriere als auch als besonders wirkstofftragende Membran bei der *In-vivo*-Distribution eine herausragende Rolle spielt, wird sie unter III.1.4 detailliert beschrieben.

Das *Trabekelwerk* stellt ein Filtersystem dar, durch welches das Kammerwasser in den Schlemm'schen Kanal sickert. Es besteht aus Gewebebälkchen, die netzartig miteinander verwoben sind. Das Trabekelwerk erstreckt sich zwischen Cornea, Sclera und Ziliarkörper.

Der Begriff *Uvea* umfasst die gefäßreichen Gewebe im Augeninnern: die *Iris*, den *Corpus ciliare (Ziliarkörper)* und die *Chorioidea (Aderhaut)*.

Die Chorioidea besteht aus einem schichtartig übereinanderliegenden System von Blutgefäßen. Außen liegen scleraseitig große Arterienäste der *Aorta ciliares* und die Vortexvenen. Weiter innen befindet sich ein Netz von mittelgroßen Adern.

Im vorderen Drittel des Augapfels liegt der *Ziliarkörper*. Wie ein Kranz umfasst er das Fenster der Cornea. Der Ziliarkörper ist mit einem zweischichtigen Epithel bedeckt. Das äußere, muskelseitige Blatt enthält Pigment (pigmentiertes Ziliarepithel). Die innere Zellschicht ist ein zylindrisches, nicht pigmentiertes Epithel.

Die *Iris* ist eine dünne Gewebescheibe, die vorn aus dem lockeren Irisstroma und hinten aus dem Pigmentblatt, einer Fortsetzung des pigmentierten Ziliarepithels, aufgebaut ist. Die Einsenkung zwischen Iris und Ziliarkörper wird als *Sulcus ciliaris* bezeichnet.

Die *Linse* ist ein wesentlicher Teil des optischen Systems des Auges. Im Gegensatz zur Cornea besteht ihre Masse fast vollständig aus intrazellulärem Material, das von einer relativ festen, elastischen Kapsel aus Glykoproteinen umhüllt ist.

Der *Corpus vitreum* (Glaskörper) füllt mit einem Volumen von rund 4 ml das Innere des Augapfels aus. Sein Aufbau schützt und unterstützt die ihn umgebende Retina. Die gallertartige Masse des Glaskörpers enthält ein Gerüst aus kollagenen Fibrillen. In die Lücken des kollagenen Gerüsts winden sich die Riesenmoleküle der Hyaluronsäure. Ihre polaren Gruppen binden an den Schwefelsäureresten Wasser, das 98% der Masse des Glaskörpers ausmacht. Der menschliche Glaskörper enthält normalerweise keine Blutgefäße.

Die *Retina* (Netzhaut) bildet an ihrer äußeren Seite, zur Aderhaut hin, die Stäbchen und Zapfen, welche auf Licht über eine photochemische Reaktion das elektrochemische Potential erzeugen, das zur optischen Sinneswahrnehmung führt.

Die Sclera ist in den vorderen Anteilen des Augapfels von der *Conjunctiva bulbi* bedeckt. Letztere besteht aus mehreren fein vernetzten, bindegewebigen Blättern. Dieses lockere conjunctivale Stroma ist reichlich von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen. Im Bereich des Äquators wendet sich die *Conjunctiva* um und zieht vom Augapfel auf die Innenseite der Lider. Sie bildet dort die *Conjunctiva tarsi*.

Alle Blutgefäße der *Conjunctiva* zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sich bei verschiedenartigsten Reizen rasch und stark erweitern zu können. Sie sondern dann Exsudat und Blutzellen in das conjunctivale Stroma ab, die als entzündliche Schwellung erscheinen (Conjunctivitis).

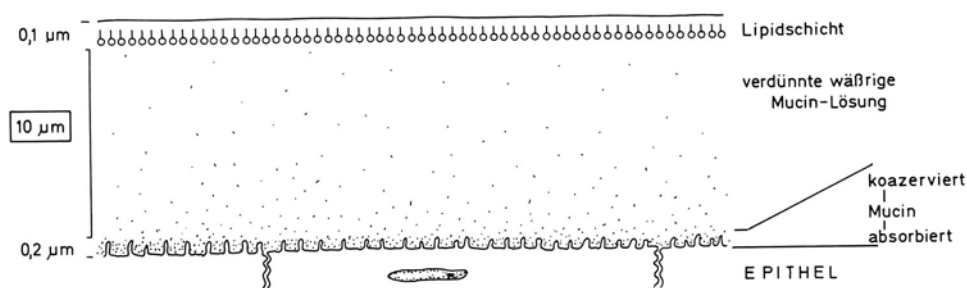
Die Oberfläche der *Conjunctiva* ist von einem mehrschichtigen Epithel bedeckt, das am Rand (*Limbus*) in das Corneaepithel übergeht. Zwischen den Plattenepithelzellen befinden sich Becherzellen. Ihr schleimiges Sekret enthält Glykoproteine (Mucin) und leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur Bildung des präcornealen Tränenfilms [177].

### *III.1.2. Die Tränenflüssigkeit*

Die Selbstreinigung der den äußeren Einflüssen ausgesetzten Hornhautvorderseite wird durch den Lidschlag und die Sekrete aus den Tränendrüsen gewährleistet. Die geringste Reizung (z.B. durch Staubpartikel) löst einen Reflex aus, der zum Lidschlag und demzufolge zur Tränenausscheidung führt. Die Augenlider, die auf ihrer Innenseite mit Bindehautgewebe ausgekleidet sind, bewirken außerdem einen fünf- bis zehnmal pro Minute auftretenden,

unwillkürlich ausgelösten Lidschlag, der, unterstützt durch das Sekret der Tränendrüsen, den Tränenfilm gleichmäßig auf der Oberfläche der Cornea verteilt und somit deren Austrocknung und eine daraus resultierende Trübung verhindert [185].

Die Tränenflüssigkeit bedeckt die Oberfläche von Conjunctiva und Cornea und erfüllt dabei eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Die Bildung des Tränenfilms erfolgt in den Tränendrüsen (Glandulae lacrimales), den Becherzellen und den akzessorischen Tränendrüsen der Conjunctiva. Der präcorneale Tränenfilm hat eine Dicke von 5-10  $\mu\text{m}$  [44, Abb. 2]. Das Volumen der Tränenflüssigkeit am Auge beträgt normalerweise 6,3-10  $\mu\text{l}$  [44, 177]. Die durchschnittliche Umsatzrate beträgt beim Menschen ungefähr 15% pro Minute, d.h. ca. 1 ml/ 24 h, wobei die Tränenproduktion nachts fast gänzlich eingestellt ist. Die Tränenflüssigkeit wird demzufolge etwa viertelstündlich erneuert [44]. Die dabei erfolgende Ableitung über die Tränenkanäle zum Tränennasenkanal wirkt sich nachteilig auf die Bioverfügbarkeit lokal applizierter Augenarzneimittel aus.



**Abb. 2: Tränenfilm; nach [177]**

Die Tränenflüssigkeit enthält eine Vielzahl anorganischer und organischer Bestandteile (Tabelle 1), die die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Tränenfilms determinieren. Der Tränenfilm weist drei Schichten auf (Abb. 2): Auf der hydrophoben Oberfläche des Corneaepithels liegt eine hydrophile Mucinschicht. Nach außen folgt eine wässrige, niedermolekulare Substanzen und Proteine enthaltende Schicht. Eine Lipidschicht, bestehend aus hochmolekularen Fettsäureestern, zieht sich außen wie ein dünnes Häutchen, wahrscheinlich als monomolekulare Schutzschicht, über die wässrige Phase.

Der Gesamtproteingehalt der Tränenflüssigkeit liegt zwischen ca. 6 und 20 g/l [74] (Tabelle 1). Das Tränenalbumin, das bei bestimmten entzündlichen Prozessen vermehrt auftritt, wird



vor allem für die präcorneale Proteinbindung diverser Arzneistoffe verantwortlich gemacht [142], wohingegen das bakteriolytisch wirksame Lysozym (HTL), eine Muramidase, eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr spielt [185]. Weiterhin enthält die Proteinfraction immunkompetente Gammaglobuline sowie diverse Enzymsysteme (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Eigenschaften und Zusammensetzung der humanen Tränenflüssigkeit; nach [177]**

EIGENSCHAFTEN			
Sekretionsrate [μl/min]		2,4	
Volumen [μl]		6,3 [177]; 7-10 [44]	
Osmotischer Druck [mOsm/kg]		311-350 [138]	
pH-Wert		7,4 (7,14-7,82), abhängig v. d. Tageszeit [32]	
BESTANDTEILE			
H <sub>2</sub> O-Gehalt [%]		98,2%	
Elektrolyte	[mmol/l]	Enzyme	[mmol/(min·ml)]
Na <sup>+</sup>	142	β-N-Acetylglucosaminidase	0,24
K <sup>+</sup>	15	β-Galactosidase	0,9
Cl <sup>-</sup>	135	α-Galactosidase	2,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3-25	β-Glucuronidase	2,0
Ca <sup>++</sup>	0,3-1,0	saure Phosphatase	40,0
Mg <sup>++</sup>	0,3-1,0	Amylase	800,0
Laktat	1,85	Laktatdehydrogenase	2000
Pyruvat	0,18	Malatdehydrogenase	1600
Glucose	0,18	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	150
Proteine	[g/l]	Immunglobuline	[g/l]
Albumin	4	IgG	0,001
Globuline	3	IgA	0,2-1,0
Lysozym	1-2	IgM	0,01-0,04
Lactoferrin	1-2	IgE	0,0001
Glycosaminoglykane	0,6		
Mucine	1,0		

### III.1.3. Das Kammerwasser

Das Kammerwasser ist eine klare, wässrige Flüssigkeit, die die Räume der Hinter- und Vorderkammer ausfüllt. Es wird im Ziliarkörper durch Filtration und Sekretion aus dem Blutplasma abgesondert, umspült Iris und Linse, benetzt die Hornhautrückfläche, fließt durch das Trabekelwerk im Kammerwinkel in den Schlemm'schen Kanal und weiter durch die Kammerwasservenen transscleral über das venöse Kreislaufsystem der Conjunctiva ab.

**Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des Kammerwassers<sup>1</sup> im Vergleich zum Blutplasma; nach [177]**

	Plasma	Kammerwasser
Protein [g/l]	6-7	0,01-0,05
Elektrolyte und Nichteletrolyte [mmol/l]		
Na <sup>+</sup>	151	144
K <sup>+</sup>	4,7	4,6
Ca <sup>++</sup>	2,6	1,7
Mg <sup>++</sup>	1,0	0,08
Cl <sup>-</sup>	118	109
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27	34
Laktat	2-4	7,2
Pyruvat	0,2	0,6
Glucose	7-8	6,6-6,9
Fructose	0,07	0,2
Ascorbinsäure	0,02	1,5
Harnstoff	9	7

<sup>1</sup> beim Kaninchen, die Werte sind ähnlich wie beim Menschen.

Das Kammerwasser enthält Elektrolyte und nichtionische Komponenten, die in Tabelle 2 vergleichend zum Plasma dargestellt sind. Der Glucosegehalt ist geringfügig niedriger als im Plasma. Die Laktat- und Pyruvatspiegel sind drei- bis viermal höher und der Ascorbinsäurespiegel ist 75mal höher als im Blutplasma. Die Proteinkonzentration im Kammerwasser ist im Vergleich zum Plasma äußerst niedrig (Tabelle 2).

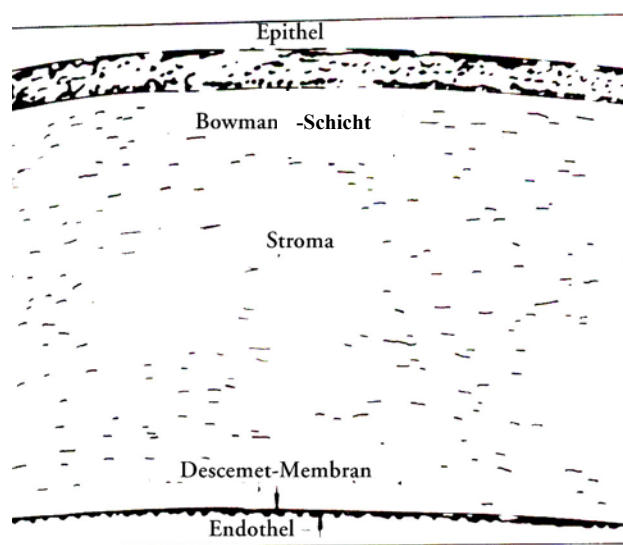
Das Volumen (ca. 200 µl (Kaninchen)) der Vorderkammer wird durch Zufluss und Abfluss konstant gehalten. Dadurch bilden die Augenkammern in dem geschlossenen System des Augapfels das regelbare Volumen, mit dem der Augeninnendruck eingestellt wird. Das zu- und abfließende Volumen und damit die Sekretionsrate des Ziliarkörpers beträgt im Durchschnitt 4 µl/min. Im Wesentlichen werden aber der Kammerwasserstrom und der Augeninnendruck durch den Abfluss über das Trabekelwerk reguliert. Diese Struktur hat demnach für die Physiologie und Pathophysiologie des Auges eine große Bedeutung [177].

Das Ziliarepithel bildet durch die *Zonulae occludentes* eine Diffusionsbarriere (Blut-Kammerwasserschranke) zwischen dem extrazellulären Raum bzw. den Kapillaren des Ziliarkörpers und der Hinterkammer. Die Blut-Kammerwasserschranke wird bei Entzündungen, perforierenden Verletzungen des Augapfels sowie nach Verätzungen des

vorderen Augensegments verstärkt durchlässig. Dann verändert sich die Zusammensetzung des Kammerwassers für Stunden oder länger bis die Schädigung beseitigt ist. Typisch ist in diesem Zusammenhang der Anstieg des Proteingehalts durch Serumeiweißkörper [177].

#### III.1.4. Die Cornea

Die Cornea wird in fünf Schichten unterteilt: *Corneaepithel*, *Bowman-Schicht*, *Stroma* (*Corneaparenchym*), *Descemet-Membran* und *Corneaendothel* (Abb. 3).



**Abb. 3: Aufbau der Cornea; nach [185]**

*Epithel:* Die Oberfläche der Hornhaut wird von einem 5-7schichtigen, nicht verhornten Plattenepithel bedeckt. Die Basalzellen stehen in zylindrischer Form auf einer Basallamelle und sind durch Hemidesmosomen mit ihr verbunden. Geht diese Verbindung verloren, löst sich der Epithelverband in Blasen vom Stroma. Es entstehen schmerzhafte rezidivierende Hornhauterosionen [177].

*Stroma:* Das Hornhautstroma hat den größten Anteil an der Gewebemasse der Cornea. Nur 5-10% des Stromavolumens werden von Zellen, den Keratozyten, ausgefüllt. Der übrige Teil, mindestens 90%, ist dem extrazellulären Raum zuzuordnen. Das extrazelluläre Material besteht größtenteils aus regelmäßig aufgebauten kollagenen Fibrillen, zwischen die eine interfibrilläre Matrix aus Proteoglykanen eingelagert ist. Letztere sorgen durch ihre konstante Molekülgröße für einen gleichbleibenden Abstand zwischen den kollagenen Fibrillen. Der gitterähnliche Aufbau des Hornhautstromas aus den 10-30 nm dicken kollagenen Fibrillen

bildet die physikalische Grundlage für die Erklärung der Transparenz dieses Gewebes. Zum Epithel hin sind die kollagenen Fibrillen verdichtet, so dass eine glatte konvexe Oberfläche entsteht, die *Bowman-Membran (Lamina limitans anterior)*. Auch auf der konkaven Rückseite der Cornea findet sich eine Verdichtung der Strukturproteine, die sich mikroskopisch homogen darstellen und bei der Präparation als glasartige Lamelle leicht zu isolieren sind. Auf dieser Schicht, der *Descemet-Membran (Lamina limitans posterior)*, liegt das einschichtige Endothel, die Abgrenzung der Cornea zum Kammerwasser [177].

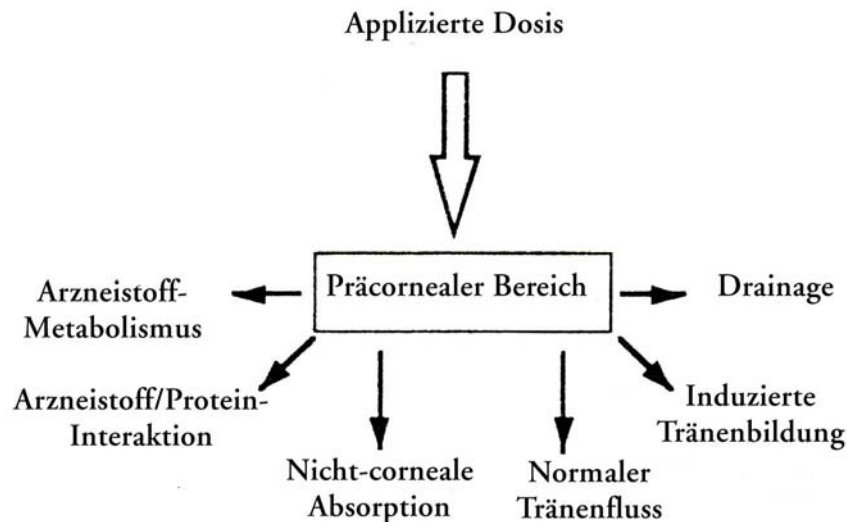
*Endothel:* Beim Blick von hinten auf die Cornea stellt sich das Endothel als eine regelmäßige, aus hexagonalen Zellen zusammengesetzte Schicht dar. Die Endothelzellen enthalten zahlreiche Mitochondrien, ein endoplasmatisches Retikulum und pinozytische Bläschen. Sie sind durch Zonulae occludentes (Schlussleisten) miteinander verbunden. Das Endothel wirkt als Diffusionsbarriere, die das Kammerwasser daran hindert, in das Corneastroma einzudringen. Die Endothelzellen kontrollieren durch aktiven Transport und selektive Diffusion den Stoffaustausch zwischen Cornea und Kammerwasser (Abb. 2). Die Zufuhr von nutritiven Metaboliten (z.B. Glucose und Aminosäuren) erfolgt aus dem Kammerwasser [177]. Stoffwechselprodukte (z.B. Laktat) diffundieren aus dem Corneastroma durch das Endothel in entgegengesetzter Richtung in das Kammerwasser. Durch aktiven Transport bringt das Endothel die Ionen  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in das Kammerwasser. Sie ziehen auf ihrem Wege Wasser aus dem Stroma mit. Dadurch wird die makromolekulare Grundsubstanz des Stromas dehydriert und in einen Zustand der Entquellung versetzt. Dieser physikalisch-chemische Spannungszustand bildet eine wichtige Grundlage für die Transparenz des Stromas.

## **III.2. Lokale Therapie in der Augenheilkunde**

### *III.2.1. Allgemeines*

Nach Applikation eines Augentropfens (25-50  $\mu\text{l}$ , je nach Applikation) wird der Hauptanteil der Arzneistofflösung rasch von der Augenoberfläche gespült und das Lösungsvolumen reduziert sich auf das normale Tränenvolumen von etwa 7,5  $\mu\text{l}$  [35]. Danach bleibt das präcorneale Lösungsvolumen konstant, aber die Konzentration des Arzneistoffs nimmt durch dessen corneale und nicht-corneale Absorption sowie durch die Verdünnung mit Tränen-

flüssigkeit ab [152, 153]. Die Drainageraten nehmen üblicherweise mit zunehmender Viskosität der Tränenflüssigkeit ab [131, 132, 248] und werden durch größere Augentropfenvolumina erhöht [35]. Der normale Tränenfluss beträgt beim Kaninchen 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  [35] und beim Menschen 1,2  $\mu\text{l}/\text{min}$  [139, 216]. Dieser spielt jedoch im Normalfall eine untergeordnete Rolle für den Arzneistoffverlust aus dem präcornealen Bereich.

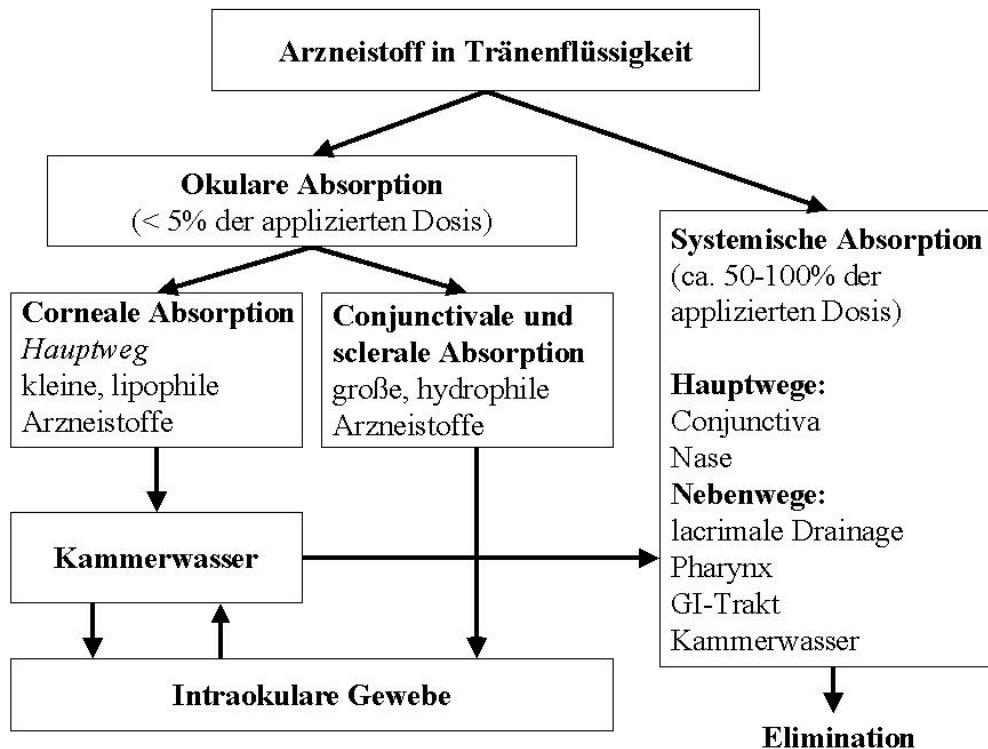


**Abb. 4: Wege, die die Bioverfügbarkeit topisch applizierter Ophthalmika beeinflussen; nach [122]**

Allerdings wirken sich Arzneistoffe oder Vehikel, die aufgrund von Irritationen einen stärkeren Tränenfluss induzieren, negativ auf die Arzneistoffverfügbarkeit aus. Abb. 4 zeigt die möglichen Verlustwege von topisch applizierten Augentropfen.

Der Stofftransport ins Augeninnere erfolgt nicht allein via Cornea, sondern auch die Absorption über die Conjunctiva stellt einen wichtigen Weg dar (Abb. 5). Die Oberfläche der Conjunctiva ist wesentlich größer als die der Cornea [240], und damit beträgt die Permeabilität für Arzneistoffe, in Abhängigkeit von deren individuellen physiko-chemischen Eigenschaften, häufig das Zwei- bis 30fache [2, 239].

Die Cornea wird im Allgemeinen als Hauptweg, aber nicht als einziger entscheidender Weg für die Penetration und Permeation topisch applizierter Arzneistoffe am Auge betrachtet. Die Conjunctiva und Sclera werden für die meisten Arzneistoffe als leichter permeierbar gegenüber der Cornea [2, 8, 239] angesehen.



**Abb. 5: Absorptionswege topisch applizierter Ophthalmika; nach [122]**

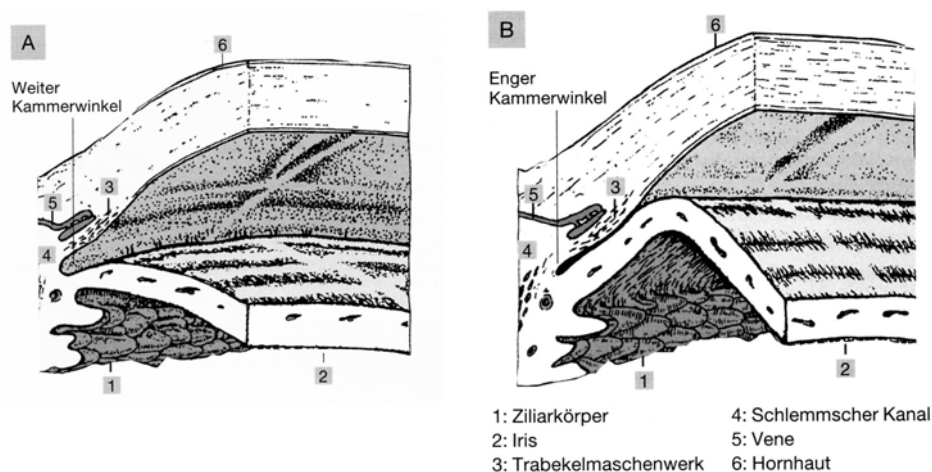
Corneaepithel und -stroma sind die wichtigsten Barrieren für den Arzneistofftransport [83]. Für die corneale Permeabilität ist die Lipophilie eines Moleküls die dominante Eigenschaft [2, 8, 239]. Der optimale apparente Verteilungskoeffizient (Octanol/Puffer pH 7,4) der Wirkstoffe für eine corneale Arzneistoffpermeation wird im Bereich von 100-1000 angegeben [200, 201]. Für hydrophile Moleküle ist das corneale Epithel die am schwierigsten zu überwindende Barriere, für lipophile Stoffe das hydrophile Stroma. Neben der Lipophilie eines Arzneistoffs sind seine Wasserlöslichkeit [210], Molekülgröße [114] und Ladung [115] sowie sein Ionisationsgrad [21, 43, 210] für die corneale Permeabilität ausschlaggebend.

Die Tränenflüssigkeit weist eine begrenzte Pufferkapazität auf [31]. Demzufolge haben pH-Wert und Pufferkapazität der applizierten Lösung nicht nur Einfluss auf die Ionisierung des Wirkstoffs, sondern auch auf die pH-Situation der Tränenflüssigkeit [3, 130] im präcornealen Bereich. Die nichtionisierte Form eines Moleküls permeiert normalerweise die Cornea leichter als die ionisierte Form [16]. Demzufolge sind pH-Wert und Pufferkapazität einer Augentropfenlösung auch von entscheidendem Einfluss auf die okulare Arzneistoffabsorption.

Im Folgenden sollen als spezielle ophthalmologische Indikationsgebiete das Glaukom (III.2.2) sowie immunologische Erkrankungen (III.2.3) herausgegriffen werden, da die zu untersuchenden Wirkstoffe (s. Problemstellung) auf diese Anwendungsgebiete zielen.

### III.2.2. Glaukom

Unter dem Begriff „Glaukom“ werden Krankheitszustände zusammengefasst, deren gemeinsames Symptom eine Erhöhung des Augeninnendrucks (Intraocular Pressure – IOP) ist. Bei einem Druck größer als 23-25 mmHg liegt ein Verdacht auf ein Glaukom vor; bei einem Druck über 29 mmHg kann diese Erkrankung angenommen werden. Bei manifestem Glaukom ist das Gleichgewicht zwischen intraokularem Druck und okularer Durchblutung gestört. Eine anhaltende Herabsetzung des arteriellen Perfusionsdrucks führt zur Atrophie der Sehnervenfasern, woraus Defekte und Ausfälle des Gesichtsfelds und letztlich Erblindung resultieren. Die Erhöhung des IOP ist zumeist die Folge eines beeinträchtigten Abflusses des Kammerwassers bei offenem Kammerwinkel (*Weitwinkelglaukom, Glaucoma simplex*) [150].



**Abb. 6: Weiter (A) und enger (B) Kammerwinkel;** nach [146]

Davon abgrenzbar sind *Winkelblockglaukome* bei engem Kammerwinkel (*Engwinkelglaukome*) und sog. *Sekundär-Glaukome*, z.B. bei Gefäßveränderungen im Kammerwinkelbereich, Zustand nach Operationen oder nach Therapie mit Glucocorticoiden (systemisch oder lokal am Auge) [150], woraus ebenfalls ein erschwerter Kammerwasserabfluss resultieren

kann [146].

Beim Weitwinkelglaukom, der häufigsten Glaukomform des Erwachsenen (95% aller Fälle), kann das Kammerwasser durch das Trabekelmaschenwerk, welches den Kammerwinkel auskleidet, infolge struktureller Veränderungen der Trabekel nur schwer hindurchgelangen. Als weiteres Abflusshindernis kommt eine Drucksteigerung in den kammerwasserableitenden Venen in Betracht [146].

An erster Stelle der Glaukombehandlung steht die medikamentöse Therapie. Über neunzig Prozent der Glaukomkranken können mit Augentropfen behandelt werden. Tritt hiermit der gewünschte Erfolg nicht ein, kommen eine Laserbehandlung oder eine Operation in Betracht. Die medikamentöse Glaukomtherapie verfolgt drei Ziele:

#### 1. Augeninnendrucksenkung

Alle bisher zur Verfügung stehenden Glaukom-Medikamente senken den Augeninnendruck durch Verbesserung des Kammerwasserabflusses und/oder durch Herabsetzung der Kammerwasserproduktion. Die Senkung des Augeninnendrucks hat eine Entlastung des Sehnervs und eine Verbesserung der Nährstoffversorgung von Netzhaut und Sehnerv zur Folge [245].

#### 2. Verbesserung der Netzhaut- und Sehnervdurchblutung

Bei Glaukompatienten kann die Durchblutung oder die Regulation der Blutversorgung an Netzhaut und Sehnerv zusätzlich gestört sein. Aus diesem Grund kann ein positiver Einfluss auf die Sehnerv- und Netzhautdurchblutung wünschenswert sein. Bei gleichzeitiger Augeninnendrucksenkung und Verbesserung der Durchblutung spricht man von Co-Regulation [245].

#### 3. Schutz der Nervenzellen vor schädigenden Einflüssen

Beim Glaukom kommt es allmählich zum Untergang von Nervenzellen. Gelingt es, diesen Untergang der Nervenzellen zu verhindern oder zu verlangsamen, so spricht man von Neuroprotektion [245].

Die folgenden Medikamentengruppen haben in der Glaukomtherapie Bedeutung:

#### *Direkte Parasympathomimetika*

*Pilocarpin* und seine Salze sind bereits seit 1876 im Einsatz und repräsentieren die ersten lokalen Glaukom-Medikamente. Sie senken den Augeninnendruck, indem sie die Kanälchen weiten, durch die das Kammerwasser abfließt. Aufgrund ihrer pupillenverengenden Wirkung (griech. miosis) werden sie auch Miotika genannt. Alte Menschen mit einer zusätzlichen Linsentrübung fühlen sich häufig durch die begleitende Miosis beeinträchtigt. Jedoch führen



diese Wirkstoffe auch bei jüngeren Patienten zu verschlechtertem Dämmerungssehen, Blendempfindlichkeit oder einer durch das Medikament hervorgerufenen Kurzsichtigkeit (Myopie). Für Pilocarpin, das häufig als Modellarzneistoff für die verschiedensten ophthalmologischen Untersuchungen genutzt wird, existiert eine Vielzahl etablierter und potentieller galenischer Formulierungen (vgl. III.3.1.2, Tabelle 7). Weitere Antiglaukomatosa dieser Gruppe sind Carbachol (Carbamann<sup>®</sup>) und Aceclidin (Glaucotat<sup>®</sup>) [146].

#### *Betarezeptorenblocker*

Seit mehr als 25 Jahren sind Betarezeptorenblocker als Antiglaukomatosa im Einsatz. Sofern beim Patienten keine Gegenanzeigen, wie z.B. Asthma, niedriger Blutdruck oder Herzerkrankungen, bestehen, sind Betablocker (im Allgemeinen in Form von wässrigen Augentropfen) die Therapie der ersten Wahl. Sie müssen 1-2mal täglich getropft werden und verursachen in der Regel kaum okulare Probleme. Die Senkung des Augeninnendrucks erfolgt über eine Drosselung der Kammerwasserproduktion. Auch in Kombinationen mit Pilocarpin (z.B. Fotil<sup>®</sup>, Normoglaucan<sup>®</sup>, Timpilo<sup>®</sup>, TP-Ophthal<sup>®</sup>) oder Carboanhydrasehemmern (z.B. Cosopt<sup>®</sup>) werden Betablocker häufig eingesetzt [245].

#### *Carboanhydrasehemmer*

Seit einigen Jahren gibt es mit *Dorzolamid* den ersten Carboanhydrasehemmer in Form von Augentropfen (Trusopt<sup>®</sup>), der gegenüber dem systemisch zu applizierenden Vorläufer Azetazolamid nur noch lokal am Auge wirkt. Vor kurzem ist eine zweite Substanz, das *Brinzolamid*, hinzugekommen, das als 1%ige Suspension (Azopt<sup>®</sup>) angeboten wird. Die Hemmung des Enzyms Carboanhydrase (vorrangig im Ziliarkörper) führt zu einer Regulation der Kammerwasserproduktion und auf diese Weise zur Senkung des Augeninnendrucks. Außerdem sprechen zahlreiche Untersuchungen mit Dorzolamid dafür, dass die Substanz auch direkt die Durchblutung am Sehnerv und an der Netzhaut verbessert [215]. Für Dorzolamid konnte in Untersuchungen am Tier auch eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Sehnervs gezeigt werden [215]. Nach dem Eintropfen kann es kurzfristig zu einer Bindehautreizung und gelegentlich metallischem Geschmack im Mund kommen. Die Anwendung erfolgt in der Monotherapie dreimal täglich und in der Kombination mit Betablockern (z.B. Cosopt<sup>®</sup> mit Timolol) zweimal täglich.

### *Alpha-adrenerge Substanzen*

Zu dieser Gruppe gehören die Wirkstoffe *Clonidin* (Aruclonin<sup>®</sup>, Clonid-Ophthal<sup>®</sup>, Dispaclonidin, Isoglacon<sup>®</sup>), *Apraclonidin* (Iopidine<sup>®</sup>) und das relativ neue *Brimonidin* (Alphagan<sup>®</sup>). Da Brimonidin sehr viel spezifischer auf einen bestimmten Typ der Alpharezeptoren (Alpha-2-Selektivität) wirkt, zeigt die Substanz weniger Nebenwirkungen als ihre Vorgänger. Neben einer Senkung der Kammerwasserproduktion kommt es auch zu einer Verbesserung des Kammerwasserabflusses. Aufgrund von Tierversuchen wird zusätzlich eine neuroprotektive Wirksamkeit vermutet. Nebenwirkungen, die bei den drei Substanzen unterschiedlich ausgeprägt sein können, sind: Blutdrucksenkung, Müdigkeit und Mundtrockenheit [245].

### *Prostaglandin-Analoga*

Auch Prostaglandin-F<sub>2α</sub>-Analoga (Latanoprost<sup>®</sup>, Travatan<sup>®</sup>) werden in der Glaukomtherapie eingesetzt. Da diese Substanzen bereits in sehr kleinen Mengen Wirkung zeigen, ist eine lokale Anwendung nur einmal am Tag notwendig. Prostaglandine bewirken vermutlich eine Entspannung des Ziliarmuskels und über den Ab- bzw. Umbau von Strukturen im Ziliarmuskel eine Verbesserung des Kammerwasserabflusses [174]. Dadurch kann der Augeninnendruck gesenkt werden. Die Prostaglandin-Therapie verursacht bei 20-25% der Anwender eine Augenrötung; in einigen Fällen wird eine dauerhafte Verfärbung der Iris beschrieben [174]. Eine weitere ungewöhnliche Nebenwirkung führt bei einigen Patienten zum verstärkten Wimpernwachstum.

Außerdem kann Bimatoprost (Lumigan<sup>®</sup>) angewendet werden. Es ist ein synthetisches Prostaamid, das zwar eine strukturelle Ähnlichkeit zu Prostaglandin F<sub>2α</sub> aufweist, jedoch nicht über die bekannten Prostaglandinrezeptoren wirkt. Bimatoprost ahmt selektiv die Wirkungen von vor kurzem entdeckten körpereigenen Prostaaminen nach [55].

### *Kombinationen*

Kann mit einer Monotherapie der Augeninnendruck nicht ausreichend gesenkt werden oder wird das Gesichtsfeld trotz guter Drucksenkung schlechter, so werden in der Regel Wirkstoff-Kombinationen eingesetzt. Besonders wenn durchblutungsbedingte Risikofaktoren hinzukommen, ist neben der Applikation eines Betablockers die zusätzliche Gabe eines Carboanhydrasehemmers indiziert. Als fixe Kombinationen stehen *Betablocker mit*

*Pilocarpin, Betablocker mit Carboanhydrasehemmern und Betablocker mit Prostaglandin (Xalacom<sup>®</sup>) zur Verfügung (s.o.).*

Diese haben für den Patienten den Vorteil, dass sie gegenüber der Gabe von zwei Einzelpräparaten das Auge nicht übermäßig mit Konservierungsmitteln belasten und die Compliance verbessern. Allerdings ist es heute bereits möglich, auf konservierungsmittelfreie Mehrdosenbehältnisse mit Comod<sup>®</sup>-System zurückzugreifen.

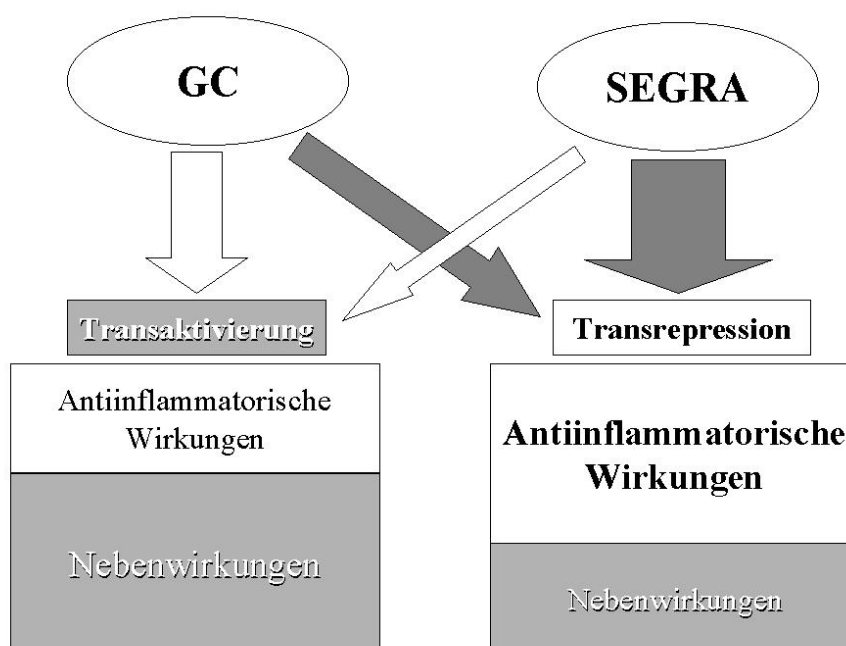
### *III.2.3. Immunologische Erkrankungen*

Entzündungen einzelner Abschnitte der Iris, des Ziliarkörpers oder der Aderhaut (Uveitis) können eintreten bei direkten Traumen mit Infektionen des Augeninnern oder bei allgemeiner Sepsis auf hämatogenem Wege. Die klassische Uveitis ist eine allergisch-hyperergische, also immunologisch bedingte Erkrankung. Dabei können Bakterienendotoxine eine Rolle spielen. Nicht selten sind Iritis (Regenbogenhautentzündung), Zyklitis (Entzündung des Ziliarkörpers) oder Chorioiditis (Entzündung der Chorioidea (Aderhaut des Auges)) immunologische Reaktionen der augeneigenen Gewebe auf einen Antigenreiz. Darüber hinaus tritt eine Uveitis häufig im Zusammenhang mit allgemeinen, zum Teil immunologischen Erkrankungen auf. Dazu gehören rheumatische Erkrankungen und Vaskulitiden. Außerdem besteht für einige Uveitiden eine immunologische Disposition durch bestimmte Antigene der Zelloberfläche des HLA-Systems (**H**uman **L**eucocyte **A**ntigen **S**ystem). Darunter wird eine Gruppe genetisch determinierter Gewebsantigene des Menschen, die nach Transplantationen auf einen Empfänger, dem Antigene des Transplantats fehlen, Anlass zu einer Transplantatabstoßungsreaktion geben können, verstanden. Deshalb werden sie auch Transplantations- oder Histokompatibilitätsantigene genannt [177].

Bei einer *Keratoplastik (Hornhautübertragung)*, in deren Folge es zu Immunreaktionen kommen kann, werden dichte Hornhauttrübungen mit einem Trepan entfernt und an ihre Stelle ein gleichartiges, klares Hornhautscheibchen (z.B. kryokonserviert) von verstorbenen Menschen (Allotransplantate) eingenäht. Man unterscheidet eine penetrierende Keratoplastik, bei der die Cornea in ihrer ganzen Dicke ersetzt wird, von einer lamellierenden Operation, bei der vom Wirtsgewebe eine dünne Schicht mit der Descemet-Membran und dem Endothel stehen bleibt und nur eine mehr oder weniger dicke Lamelle des vorderen Stromas ausgetauscht wird [177]. Diese Operation besitzt ein hohes Maß an Sicherheit und hat hohe

Erfolgschancen. Die Cornea als Bett des Transplantats bietet wenig Gelegenheit zu einer immunologischen Sensibilisierung. Da der Immunkontakt zum großen Teil über das Kreislaufsystem erfolgt, ist die Gefahr einer Immunreaktion umso größer, je stärker die Wirtscornea vaskularisiert ist (s. Stromale/Epitheliale Immunreaktion). (Vaskularisation bedeutet, dass vom Limbus aus Gefäße in die Hornhaut „hineinwachsen“.)

Eine Immunreaktion nach Keratoplastik ist an einer pericornealen Rötung zu erkennen und kann entweder das Endothel oder das Stroma einschließlich Epithel betreffen:



**Abb. 7: Hypothese für die Induktion molekularer Mechanismen für klassische GC und SEGRA; nach [196]**

*Endotheliale Immunreaktion:* Im Spaltlampenmikroskop treten sichtbar Stellen auf, die sich auf die Rückseite des Transplantats setzen und dort Präzipitate bilden. Sie können, wenn ihre Zahl groß genug ist, das ganze Corneaendothel des Transplantats bedecken. Dann treten eine ödematöse Trübung des Stromas und ein bullöses Ödem des Epithels auf. Das Transplantat ist damit wertlos geworden [177].

*Stromale/Epitheliale Immunreaktion:* Eine Immunreaktion kann auch von Blutgefäßen ausgehen, die von der Wirtscornea das Transplantat berühren. Hierbei erfolgt eine leukozytäre Invasion in das Stroma mit einer nachfolgenden Vaskularisation. Auf diese Weise wird das vorher klare Transplantat ebenfalls in eine vaskularisierte, gequollene, narbige Hornhaut

umgewandelt [177].

Die medikamentöse Therapie okularer immunologischer Erkrankungen nutzt vorrangig die klassischen *Glucocorticoide* (GC). GC werden seit über 50 Jahren in der Therapie akut und chronisch entzündlicher Erkrankungen eingesetzt, u.a. in der Augenheilkunde (z.B. bei Uveitis oder Immunreaktion nach Keratoplastik). Leider können aber neben den erwünschten entzündungshemmenden bzw. immunsuppressiven Effekten auch schwere und/oder nicht reversible, unerwünschte Nebenwirkungen auftreten [79, 199]. Neben individuellen Faktoren sind Dosierung und Dauer der Therapie ausschlaggebend für die Häufigkeit und den Schweregrad dieser unerwünschten Nebeneffekte. Bisher gab es keine geeignete Alternative zu den GC. Andere antiinflammatorische Therapien sind, zumindest bei bestimmten Indikationen, weniger effektiv oder weisen ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf [196].

Die dargestellten Probleme veranlassten die SCHERING AG, Berlin, eine neue Klasse antiinflammatorischer Substanzen zu entwickeln, die bei vergleichbar antientzündlichem Potential wie die GC zu weniger unerwünschten Effekten führen. Diese neuen Substanzen werden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften als *Selektive Glucocorticoid-rezeptoragonisten* (SEGRA) bezeichnet.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der wichtigsten molekularen Mechanismen einer Anzahl von Glucocorticoid-Nebenwirkungen; nach [196]**

Mechanismen (in erster Linie)	Effekt
Transrepression	Unterdrückung von ACTH (adrenocorticotropes Hormon)
	Gestörte Wundheilung
	Infektionen
	Osteoporose
Transaktivierung	Diabetes mellitus
	Glaukom
	Muskelatrophie/ Muskelmyopathie
	Osteoporose
Unbekannte Mechanismen	Kataract
	Säureulcus
	Hypertension

Der Wirkmechanismus der beiden Substanzklassen unterscheidet sich folgendermaßen: Die GC-Effekte werden durch einen spezifischen GC-Rezeptor herbeigeführt, der im Zytoplasma lokalisiert ist. Zuerst bildet sich ein Ligand-Rezeptor-Komplex, der dann in den Zellkern eindringt und die Gentranskription entweder durch Transaktivierung (positive Regulation) oder durch Transrepression (negative Regulation) moduliert. Daraus resultiert die Frage, ob diese unterschiedlichen molekularen Mechanismen (Transaktivierung/Protein-DNA-Interaktion auf der einen Seite, Transrepression/Protein-Protein-Interaktion auf der anderen Seite) für bestimmte klinisch unerwünschte Nebeneffekte (Tabelle 3) verantwortlich sind und getrennt werden können. In den letzten Jahren wurde zunehmend wahrscheinlicher, dass bestimmte GC-Nebenwirkungen hauptsächlich durch die Transaktivierung von Genen beeinflusst werden, wohingegen die antiinflammatorischen Wirkungen vorwiegend auf die Transrepression zurückzuführen sind [15, 195, 196, 197].

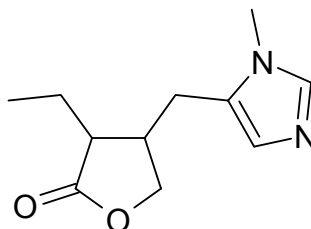
Deswegen wurde von SCHÄCKE et al. [196] die Hypothese aufgestellt, dass, falls durch neue Substanzen wie die SEGRA die Transrepression stärker induziert wird als die Transaktivierung, die Mehrheit der antiinflammatorischen Wirkungen der GC erreicht wird bei gleichzeitiger Verminderung der Nebenwirkungen (Abb. 7). Obwohl auch hier Nebenwirkungen auftreten, die in erster Linie durch Transrepression verursacht werden, haben diese insgesamt einen weit geringeren Anteil in Bezug auf den Gesamteffekt.

Der Einsatz der SEGRA zur lokalen, okularen Therapie wäre in doppelter Hinsicht interessant, da die unerwünschten Effekte neben dem ohnehin günstigen Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil noch stärker reduziert werden könnten.

Weiterhin wird MMF bisher systemisch zur Therapie okularer immunologischer Erkrankungen eingesetzt [178, 180, 181, 249, 252]. Auch hier ist eine lokale Therapie zur Minimierung von Nebenwirkungen wünschenswert (s. Einleitung).

### III.3. Arzneistoffe

#### III.3.1. Pilocarpin



Offizinell: Eur. Ph. NT 2001/USP XXVI

Es existieren zwei Monographien von Salzen der Pilocarpin-Base:

*Pilocarpinhydrochlorid* ( $C_{11}H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$ ,  $M_r = 244,72$ ) = (3*S*, 4*R*)-3-Ethyl-4-[(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)methyl]dihydro-furan-2(3*H*)-on-hydrochlorid

*Pilocarpinnitrat* ( $C_{11}H_{17}N_3O_5$ ,  $M_r = 271,3$ ) = (3*S*, 4*R*)-3-Ethyl-4-[(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)methyl]dihydrofuran-2(3*H*)-on-nitrat

##### III.3.1.1. Eigenschaften

Pilocarpin stellt das Hauptalkaloid der Blätter des Jaborandibaums, *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) und anderer *Pilocarpus*-arten [23] dar. Es wird durch die Extraktion von Jaborandiblättern, insbesondere von *Pilocarpus microphyllus*, gewonnen.

Die freie Pilocarpin-Base ist bei Raumtemperatur eine klare, gelbliche, hochviskose Flüssigkeit, die in Wasser relativ gut löslich ist. Die Substanz ist relativ stabil im Sauren (pH-Stabilitätsoptimum: < 4 [165], 4-5 [224]). Die Instabilität nimmt mit steigendem pH-Wert, vor allem bei erhöhter Temperatur, zu. Bei der Salzbildung wird der doppelt gebundene Imidazol-Stickstoff protoniert ( $pK_{a1} = 6,85$  [45]), weil dadurch ein mesomeriestabilisiertes Amidinium-Kation entsteht. Das zweite Stickstoffatom bildet nur in sehr saurem Milieu Salze ( $pK_{a2} = 1,43$  [45]).

In dieser Arbeit wird Pilocarpinhydrochlorid (P), ein leicht wasserlösliches (1:0,3), kristallines, weißes, leicht hygroskopisches Pulver verwendet.

Der pH-Wert einer wässrigen P-Lösung ist für die ophthalmologische Wirksamkeit entscheidend, da die lipophilere Alkaloidbase wesentlich besser durch die Cornea permeiert

als das dissoziierte Alkaloidsalz [10, 172]. Da sich aber, wie zuvor erwähnt, die Stabilität mit steigendem pH-Wert verschlechtert, muss bei einer Augentropfenformulierung von P ein Kompromiss zwischen den Aspekten Stabilität und Wirksamkeit/Verträglichkeit gefunden werden.

### III.3.1.2. Pharmakologie

Pilocarpinhydrochlorid (P) wirkt primär als direktes Parasympathomimetikum. Es löst bei lokaler Anwendung am Auge eine Dauerkontraktion des Musculus sphincter pupillae und des Ziliarmuskels aus. Dadurch wird einerseits die Pupille verengt (Miosis), andererseits der intraokulare Druck durch Erweiterung der Abflusswege des Kammerwassers gesenkt [146].

Die Aufnahme von P nach topischer Applikation am Auge erfolgt in erster Linie über die Hornhaut, weniger über die Bindehaut, und erreicht nach 20-40 min nennenswerte Wirkspiegel im Kammerwasser. Die Resorption ist pH- und konzentrationsabhängig [23].

Allerdings verfügt P über eine geringe okulare Bioverfügbarkeit [101]. Handelspräparate werden üblicherweise auf pH 4 bis 5 eingestellt, um die chemische Stabilität von P zu gewährleisten. In diesem pH-Bereich liegt der Wirkstoff fast vollständig ionisiert vor, was die Permeabilität durch lipophile Membranen wie die Cornea vermindert. Wenn der pH-Wert bis zum physiologischen pH erhöht wird, nimmt die okulare Arzneistoffabsorption zu [92].

P wird als 0,5 bis 4%ige Lösung zur lokalen Applikation in den Bindehautsack für die akute und die Dauerbehandlung des Glaukoms mit einem Wirkungseintritt nach 30 bis 40 min und einer Wirkungsdauer von 6 bis 8 h verwendet [85].

Nachteilig ist, dass das Auge durch die P bedingte Kontraktion des Ziliarmuskels auf den Nahpunkt akkomodiert wird, was zu vorübergehenden Sehstörungen im Sinne einer Kurzsichtigkeit (Myopie) führt [146]. Die Anwendung von P führt deshalb zur Beeinträchtigung des Verkehrsvermögens (Beeinflussung des Reaktionsvermögens).

Handelspräparate (Ophthalmika) Rote Liste 2003: AUGENÖL: (*Pilocarpin-Base*;) Pilocarpol<sup>®</sup>, Pilocarpin ankerpharm, Pilomann<sup>®</sup>-Öl; AUGENTROPFEN: (*Pilocarpin-HCl*;) Borocarpin<sup>®</sup>, Pilocarpin ankerpharm<sup>®</sup>, Pilomann<sup>®</sup>, Pilo-Stulln<sup>®</sup>, Spersacarpin<sup>®</sup> (Pilocarpinnitrat;) Pilopos<sup>®</sup>; AUGENSALBE: Spersacarpin<sup>®</sup>



### III.3.2. $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten

$\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten werden als  $\beta$ -Adrenorezeptorenblocker,  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker,  $\beta$ -Blocker und  $\beta$ -Sympatholytika bezeichnet.

#### III.3.2.1. Struktur und Eigenschaften

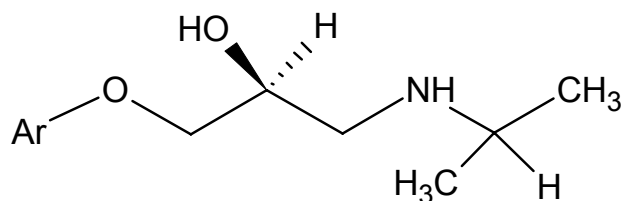
Strukturell können  $\beta$ -Blocker wie folgt eingeteilt werden: Strukturverwandtschaft mit Isoprenalin (I), Phenylethanolamin-Typ (II) bzw. Aryloxy-amino-propanolol-Typ (III).

Das essentielle Strukturelement ist – mit Ausnahme des Substituenten am NH (vgl. Tabelle 4) – in gleicher Form in den natürlichen Transmittern Adrenalin und Noradrenalin enthalten. Durch die Einführung von  $-\text{O}-\text{CH}_2-$  in die Phenylethanolamin-Atomfolge entstehen aus  $\beta$ -Sympathomimetika  $\beta$ -Sympatholytika, ebenso durch „ungewöhnliche“ Substituenten am Benzol-Ring [187]. Bei (I) und (II) sind die Wirkstoffe mit (R)-Konfiguration wirksamer als die entsprechenden Antipoden, bei (III) sind nur diejenigen mit (S)-Konfiguration überhaupt wirksam [187].

Der erste Wirkstoff, an dem  $\beta$ -sympatholytische Wirkung festgestellt wurde, war Dichlorisoprenalin (DCI). Jedoch ist diese Substanz auch ein partieller Agonist mit sympathomimetischer Wirkung und somit therapeutisch nicht brauchbar. Durch Molekülprofilierung gelang es, Verbindungen herzustellen, die keine oder nur schwache sympathomimetische Eigenwirkung (ISA = intrinsic sympathomimetic activity) besitzen. Indem eine  $-\text{O}-\text{CH}_2$ -Gruppe zwischen Aromat und C 1 (entspricht C 2 in Tabelle 4) eingeschoben wurde, entstanden die  *$\beta$ -Blocker vom Typ des Propranolols*. Eine strukturell einheitliche Gruppe stellen die Arylether chiraler 1-Amino-2,3-propandiole dar. Sie besitzen stets eine sekundäre Aminogruppe mit dem sperrigen Isopropyl- oder tert.-Butyl-Rest [187].

Tabelle 4 stellt die im Folgenden verwendeten  $\beta$ -Blocker dar. Pindolol, Mepindolol, Alprenolol und Oxprenolol weisen eine N-Isopropyl-Gruppe auf, wobei Alprenolol und Oxprenolol in Position 2 am Aromaten substituiert sind und Pindolol und Mepindolol eine heterocyclische Aryl-Gruppe besitzen.

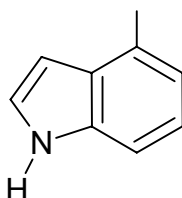
**Tabelle 4: Chemische Struktur der verwendeten  $\beta$ -Blocker**



Bezeichnung (Molformel)

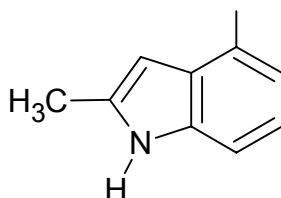
Substituent (Ar-)

Pindolol ( $C_{14}H_{20}N_2O_2$ )



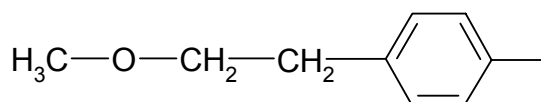
1-(4-Indolyloxy)-3-(isopropylamino)-2-propanol  
 = 4-[2-Hydroxy-3-(isopropylamino)propoxyl]-indol  
 = 1-(1H-Indol-4-yl)-3-[(1-methylethyl)-amino]-2-propanol

Mepindolol ( $C_{15}H_{22}N_2O_2$ )/ Mepindololsulfat ( $C_{30}H_{46}N_4O_8S$ )



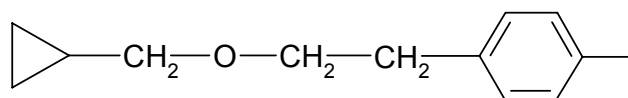
1-(Isopropylamino)-3-[(2-methyl-4-indolyl)oxy]-2-propanol  
 = 1-[(1-Methylethyl)amino]-3-[2-methyl-1H-indol-4-yl)oxy]-2-propanol

Metoprolol ( $C_{15}H_{25}NO_3$ )/ Metoprololtartrat ( $C_{34}H_{56}N_2O_{12}$ )



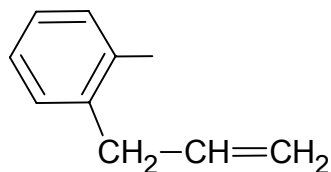
( $\pm$ )-1-Isopropylamino-3-[p-(2-methoxyethyl)phenoxy]-2-propanol  
 = ( $\pm$ )-1-[4-(2-Methoxy-ethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol

Betaxolol ( $C_{18}H_{29}NO_3$ )/ Betaxolol-HCl ( $C_{18}H_{30}ClNO_3$ )



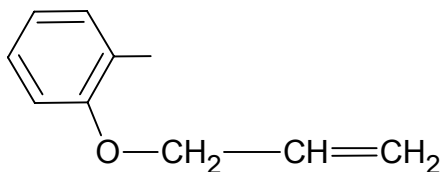
1-[p-[2-(Cyclopropylmethoxy)ethyl]phenoxy]-3-isopropylamino-2-propanol  
 = 1-[4-[2-Cyclopropylmethoxy)ethyl]phenoxy]phenoxy]-3-[(1-methylethyl)-amino]-2-propanol

Alprenolol (C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>)/ Alprenolol-HCl (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>2</sub>)



1-(o-Allylphenoxy)-3-(isopropylamino)-2-propanol  
 = 1-[(1-Methylethyl)amino]-3-[2-(2-propenyl)phenoxy]-2-propanol

Oxprenolol (C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>)/ Oxprenolol-HCl (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>3</sub>)



1-[o-(Allyloxy)phenoxy]-3-(isopropylamino)-2-propanol  
 = 1-[(1-Methylethyl)amino]-3-[2-(2-propenyloxy)phenoxy]-2-propanol

**Tabelle 5: Relative Molekülmassen (M<sub>r</sub>), Säure-Baseeigenschaften und Verteilungskoeffizienten (V<sub>K</sub>) der verwendeten β-Rezeptorenblocker**

Bezeichnung	M <sub>r</sub>	Säure-, Baseeigenschaften		Verteilungskoeffizient (V <sub>K</sub> )	
		pK <sub>a</sub>	pK <sub>b</sub>	(Octanol/P <sup>1</sup> pH 7,0)	(Octanol/P <sup>1</sup> pH 7,4)
Pindolol	248,32	8,8 [42] 9,7 (24°C) [42]	4,3 (24°C) [23]	0,20 [108]; 7,9 [23]	1,20 [225]
Mepindolol	262,36			0,54 [108]	
Mepindololsulfat	622,78	8,9 [75]			0,79 <sup>2</sup>
Metoprolol	267,4	9,7 [42]	4,3 [42]	0,18 [42, 108]	1,58 [225]
Metoprololtartrat	684,8	8,9 [25]; 9,7 [42]			
Betaxolol	307,4	9,4 [169]			3,9 [108]
Betaxolol-HCl	343,9				
Alprenolol	249,4	9,5 (20°C) [42]	4,5 (20°C) [24]	3,3 [108, 42]	21,88 [225]
Alprenolol-HCl	285,81				
Oxprenolol	265,34	9,5 [42]	4,5 [25]	0,51 [108]	5,25 [225]
Oxprenolol-HCl	301,85	9,5 ± 0,1 [36]			

<sup>1</sup>P: wässriger Puffer, <sup>2</sup>selbst bestimmt

### III.3.2.2. Pharmakologie

$\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten hemmen kompetitiv  $\beta$ -Adrenozeptoren. Durch Blockade von  $\beta_1$ -Rezeptoren wird die positiv inotrope und chronotrope Wirkung der Catecholamine am Herzen und durch Blockade von  $\beta_2$ -Rezeptoren deren erschlaffende Wirkung an der glatten Muskulatur aufgehoben. Weiterhin hemmen  $\beta$ -Blocker (durch  $\beta$ -Rezeptorblockade) Stoffwechseleffekte der Catecholamine (Glykogenolyse, Lipolyse). Therapeutisch wird vor allem die  $\beta_1$ -Blockade angestrebt [147].

Man unterscheidet  $\beta$ -Blocker mit oder ohne  $\beta_1$ -Selektivität (sog. Cardioselektivität), *partielle agonistische Aktivität* (PAA) = *intrinsische sympathomimetische Aktivität* (ISA), *unspezifische Membranwirkung* und zusätzlichen *vasodilatatorischen Effekt* [147].

*$\beta_1$ -selektive  $\beta$ -Blocker* haben den Vorteil, dass sie eine höhere Affinität zu  $\beta_1$ - als zu  $\beta_2$ -Rezeptoren aufweisen (z.B. Metoprolol und Betaxolol, Tabelle 6). Allerdings geht die Selektivität bei höherer Dosierung meist verloren; sie ist demzufolge nur *relativ* und nicht *absolut*. (Die klinische Bezeichnung Cardioselektivität ist nicht korrekt, da  $\beta_1$ -Rezeptoren nicht nur im Herzen, sondern auch in anderen Organen vorkommen. Allerdings ist die  $\beta_1$ -Rezeptorendichte im Herzen besonders groß.) Trotz dieser Einschränkung ist die  $\beta_1$ -Selektivität bei den meisten Indikationen für  $\beta$ -Blocker wünschenswert. Ein Teil der Nebenwirkungen nicht selektiver  $\beta$ -Blocker kann mit solchen Stoffen vermindert werden.

Wird bei einem  $\beta$ -Adrenozeptorenblocker angegeben, dass er partielle agonistische Aktivität besitzt, so bedeutet dies, dass es sich um eine dualistisch wirkende Substanz (partieller Agonist, partieller Antagonist) mit vorwiegend antagonistischer Wirkungskomponente handelt. Der Stellenwert der ISA ist noch nicht völlig geklärt. In den meisten Fällen dürfte aber der agonistischen Wirkungskomponente wenig Bedeutung zukommen [146]. Die Ruhfrequenz des Herzens wird bei  $\beta$ -Blockern mit ISA weniger stark gesenkt als bei anderen  $\beta$ -Blockern, was bei Patienten, die zu bradykarden Rhythmusstörungen neigen, vorteilhaft ist. Allerdings sind aber auch hier bedrohliche Bradykardien beobachtet worden.

Unter der unspezifischen Membranwirkung versteht man eine lokalanästhetische, membranstabilisierende Wirkungskomponente, die von der  $\beta$ -blockierenden Wirkung unabhängig ist. Im Allgemeinen nimmt sie mit steigender Lipophilie der  $\beta$ -Blocker zu. Bei üblicher

Dosierung sind die membranstabilisierenden Wirkungen wenig bedeutsam, da letztere erst bei Gewebekonzentrationen auftreten, die wesentlich höher liegen als die, welche für die Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren erforderlich sind.

Bei den  $\beta$ -Blockern mit zusätzlich vasodilatierender Komponente beruht der gefäßerweiternde Effekt auf einer gleichzeitigen  $\alpha_1$ -Adrenozeptorblockade (Carvedilol) oder einer partiellen agonistischen Aktivität an  $\beta_2$ -Rezeptoren (Celiprolol).

$\beta$ -Blocker sind meistens als Racemat im Handel. Allerdings wirkt das S-Enantiomer bei systemischer Anwendung (z.B. zur Bluthochdrucktherapie) etwa 50 bis 100-fach stärker  $\beta$ -blockierend als das R-Enantiomer. Als S-Enantiomere sind jedoch bisher nur Timolol und Penbutolol im Handel [188].

Zur Glaukomtherapie können dagegen (nach heutigem Wissensstand) beide Enantiomere mit gleichem Effekt angewendet werden. Um eine systemische Nebenwirkung zu vermeiden, wäre es also sinnvoll, zur topischen Anwendung am Auge das reine R-Enantiomer anzuwenden, was bisher noch nicht geschieht [188].

Tabelle 6 führt die zuvor beschriebenen pharmakologischen Wirkungsparameter der in dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Blocker auf. Die strukturverwandten Arzneistoffe Metoprolol und Betaxolol weisen  $\beta_1$ -Selektivität auf. Pindolol, Mepindolol, Alprenolol und Oxprenolol besitzen intrinsische, sympathomimetische Aktivität.

**Tabelle 6: Pharmakologische Wirkungsparameter von  $\beta$ -Blockern; nach [108];**  
**ISA = Intrinsische sympathomimetische Aktivität als Maß für die agonistische Wirkung**

	$\beta_1$ -Selektivität	ISA	Unspezifische Membranwirkung
Pindolol	-	+	(+)
Mepindolol	-	+	(+)
Metoprolol	+	-	(+)
Betaxolol	+	-	(+)
Alprenolol	-	+	+
Oxprenolol	-	+	(+)

$\beta$ -Blocker sind indiziert, wenn das  $\beta$ -adrenerge System bei der Entstehung oder Aufrechterhaltung des jeweiligen Krankheitsbildes maßgeblich beteiligt ist. Demzufolge werden  $\beta$ -Blocker bevorzugt bei koronarer Herzkrankheit, funktionellen Herz-Kreislaufstörungen, Herzrhythmusstörungen und Hypertonie eingesetzt.

Bei der Behandlung des Glaukoms wird durch  $\beta$ -Blocker die Kammerwasserproduktion gesenkt und somit der Augeninnendruck vermindert. Der Mechanismus der Drucksenkung ist allerdings noch nicht vollständig geklärt [146].

Die relevantesten Nebenwirkungen bei topischer Anwendung der  $\beta$ -Blocker treten an Herz, Kreislauf und den Atemwegen durch ihre Hemmwirkung an den sympathischen Rezeptoren auf, d.h., sie gehen auf denselben Wirkungsmechanismus zurück wie die therapeutischen Wirkungen [246].

Als *unspezifische Nebenwirkungen*, insbesondere bei systemischer Applikation, sind gastrointestinale Symptome, wie z.B. Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, beschrieben. Weiterhin kann es zu zentralnervösen Störungen, wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Benommenheit und Kopfschmerzen, kommen. Das Risiko von Nebenwirkungen am ZNS, vor allem die Müdigkeit, ist bei den gut lipidlöslichen  $\beta$ -Rezeptorenblockern am größten, bei den hydrophilen Stoffen am geringsten [108]. Als *spezifische Nebenwirkungen* durch die Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren sind Zunahme des Atemwegwiderstands, Bradykardien, Abnahme der Kontraktionskraft des Herzens, hypotone Kreislaufstörungen, Verschlechterung peripherer Durchblutungsstörungen sowie Verstärkung von Hypoglykämien bei jugendlichen Diabetikern mit Neigung zu Ketoazidose zu nennen. Alprenolol, Mepindolol, Metoprolol und Pindolol können am Auge eine Verminderung des Tränenflusses bewirken. Dieser unerwünschten Wirkung kann durch Anwendung von künstlicher Tränenflüssigkeit Abhilfe geschaffen werden [108].

Tabelle 7 führt Handelspräparate (Stand: deutscher Markt, Rote Liste 2003) auf, die  $\beta$ -Blocker enthalten und am Auge angewendet werden. Von den in dieser Arbeit ausgewählten Wirkstoffen gelangen bisher nur Pindolol und Betaxolol zur kommerziellen ophthalmologischen Anwendung. Die okular angewendeten  $\beta$ -Blocker sind in 0,1/0,25/0,5%iger Konzentration – berechnet auf die entsprechende Arzneistoff-Base – im Handel.

Die genannten systemischen Nebenwirkungen bei okularer  $\beta$ -Blocker-Gabe sind vor allem

durch den Abfluss der Tränenflüssigkeit via Tränennasengang über die Nasenschleimhaut (III.2.1) zu erklären [60] und lassen sich vermindern, indem der Patient nach Eintropfen der Lösung ins Auge mit der Fingerkuppe am medialen Augenwinkel 1-2 min einen Druck auf die Tränenkanälchen ausübt und damit diesen Abflussweg blockiert [108].

Am besten sind die Nebenwirkungen von Timolol beschrieben. Die lokalen Nebenwirkungen entsprechen denen, die auch bei anderen am Auge angewandten Wirkstoffen auftreten können. Sie bestehen aus Brennen (25%), Tränenfluss (4,6%), akuten Schmerzen (1,4%) und Photophobie (1,2%). Die systemischen Nebenwirkungen sind geringer als nach Anwendung gleich großer peroraler Dosen. Bei empfindlichen Personen, langsamen Metabolisierern oder Patienten mit vorgeschädigten Organen können sie jedoch eine ernstzunehmende Bedeutung haben. Unter der Gesamtzahl der systemischen Nebenwirkungen haben die Nebenwirkungen am ZNS einen Anteil von 34%, an Herz und Kreislauf 31%, an Atemwegen 20%, an der Haut 11% und am Magen-Darm-Trakt 4% [145].

Ein Anliegen dieser Arbeit war es, durch die Anwendung von CDe in Augentropfen, die durch Betablocker verursachten Nebenwirkungen zu reduzieren. Da, wie zuvor beschrieben, einige Betablocker durch „Aufreißen des Tränenfilms“ zur Verminderung des Tränenflusses führen, könnten CDe auf den Tränenfilm stabilisierend wirken. Studien aus der Literatur [212] berichten über den Einsatz von CDe zur Therapie des „Trockenen Auges“. Demzufolge könnten CDe als Hilfsstoffe in Tränenersatzflüssigkeiten eingesetzt werden. In Kombination mit Betablockerpräparaten wäre dann keine – wie häufig erforderlich – zusätzliche Anwendung mit künstlicher Tränenflüssigkeit notwendig.

Weiterhin könnte die Anwendung von CDe in Augentropfen im Zusammenhang mit Betablockern zu einer Retardierung der Arzneistofffreisetzung führen. Dies hätte eine erwünschte Verminderung der Applikationsfrequenz zur Folge und würde somit sowohl lokale als auch systemische Nebenwirkungen reduzieren.

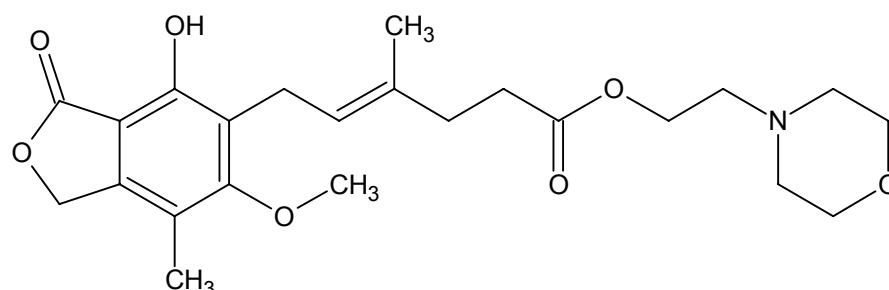
**Tabelle 7: Handelspräparate (Betarezeptorenblocker in Ophthalmika)**

<b>Betablocker</b>	<b>Salz</b>	<b>Handelspräparate (Rote Liste 2003)</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Monopräparate</i>			
Pindolol		Glauco-Stulln <sup>®</sup> AT	Pharma Stulln
		Pindoptan <sup>®</sup> AT	Kanoldt
Mepindolol		1)	
Metoprolol		1)	
Betaxolol	-hydrochlorid	Betoptima <sup>®</sup> AT	Alcon
Alprenolol		1)	
Oxprenolol		1)	
Carteolol	-hydrochlorid	Arteoptic <sup>®</sup> AT	Novartis Ophthalmics
Levobunolol	-hydrochlorid	Vistagan <sup>®</sup> AT	Pharm-Allergan
Timolol	-hydrogenmaleat	Arutimol <sup>®</sup> AT	Chauvin ankerpharm
		Chibro-Timoptol <sup>®</sup> AT	Chibret
		dispatim <sup>®</sup> AT/ gl	Novartis Ophthalmics
		duratimol <sup>®</sup> AT	durachemie
		NyoGel <sup>®</sup> gl	Novartis Ophthalmics
		Timo-COMOD <sup>®</sup> AT	Ursapharm
		Timo-EDO <sup>®</sup> AT	Dr. Mann Pharma
		Timohexal <sup>®</sup> AT	Hexal
		Timolol CV AT	Novartis Ophthalmics
		Timolol-POS <sup>®</sup> AT	Ursapharm
		Timolol-ratiopharm <sup>®</sup> AT	ratiopharm
		Timomann <sup>®</sup> AT	Dr. Mann Pharma
		Tim-Ophthal <sup>®</sup> AT	Winzer
		Timosine <sup>®</sup> / -mite AT	Chibret
		Timo-Stulln <sup>®</sup> AT	Pharma Stulln
Metipranolol	-hydrochlorid	Betamann <sup>®</sup> AT	Dr. Mann Pharma
<i>Kombinationspräparate mit Pilocarpinhydrochlorid</i>			
Timolol	-hydrogenmaleat	Fotil <sup>®</sup> AT	Novartis Ophthalmics
		Timpilo <sup>®</sup> / -forte AT	Chibret
		TP-Ophthal <sup>®</sup> AT	Winzer
Metipranolol	-hydrochlorid	Normoglaucan <sup>®</sup> / -mite AT	Dr. Mann Pharma

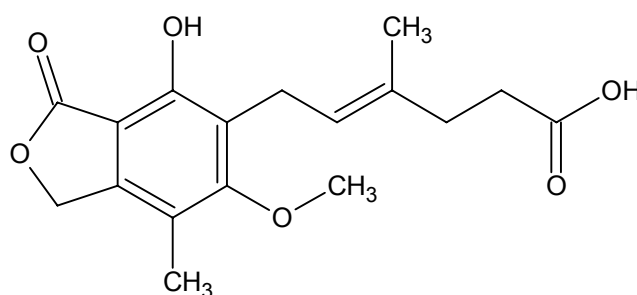
AT: Augentropfen; gl: Gel; <sup>1)</sup>bisher kein Augentropfenpräparat bekannt



### III.3.3. Mycophenolatmofetil (MMF) und Mycophenolsäure (MPA)



MMF



MPA

Es existiert keine Monographie von Mycophenolatmofetil (MMF) bzw. Mycophenolsäure (MPA) in der Ph.Eur. / USPXXVI.

Mycophenolatmofetil ( $C_{23}H_{31}NO_7$ ;  $M_r = 433,5$ )

2-(4-Morpholin)ethyl-(E)-6-(1,3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-methyl-hexenoat (Martindale)

Mycophenolsäure ( $C_{17}H_{20}O_6$ ;  $M_r = 320,3$ ) als aktiver Metabolit des MMF

6-(4-Hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-isobenzofuran-5-yl)-4-methyl-hex-4-ensäure (Hagers Handbuch)

#### III.3.3.1. Eigenschaften

MMF ist der Morpholino-Ethyl-Ester der MPA, eines Gärungsproduktes verschiedener Pilzarten der Gattung *Penicillium*. MPA wurde zunächst als Antibiotikum und antitumorales Medikament geprüft. In klinischen Studien (die allerdings nicht abgeschlossen wurden) wurde die Substanz für die Behandlung von Psoriasis getestet. Erst auf der Suche nach Substanzen

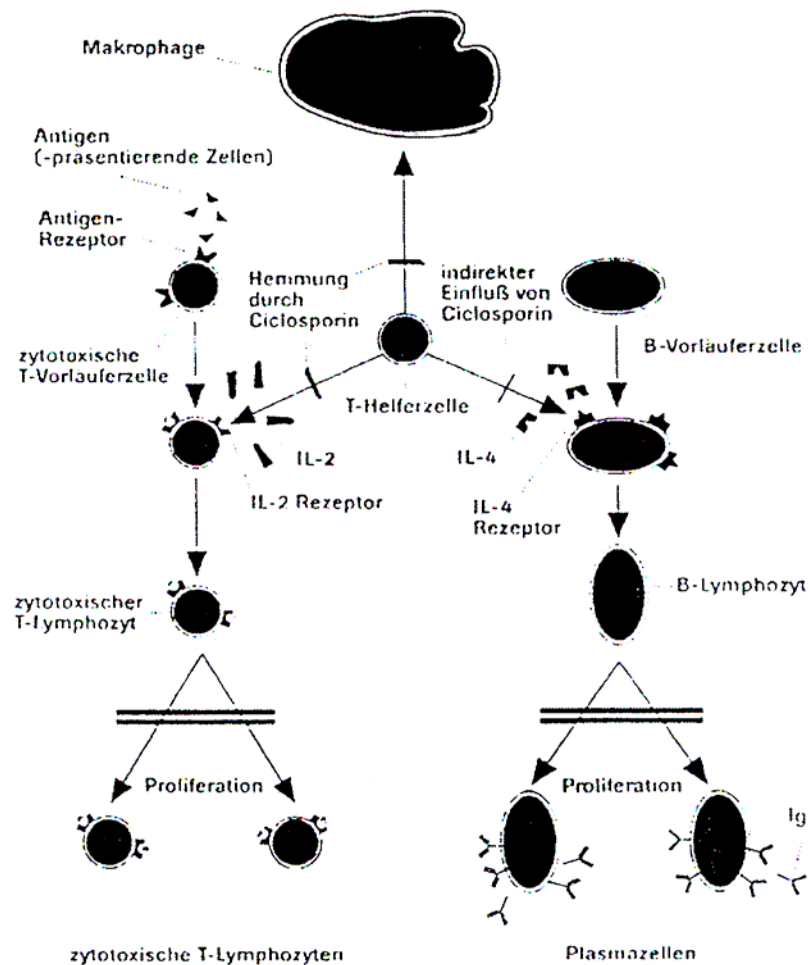
mit selektiver antiproliferativer Wirkung auf Lymphozyten, wurde MMF bzw. der aktive Metabolit MPA, wieder interessant. Eine Veresterung von MPA zum Morpholinoethylester MMF steigerte die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe bei nicht-menschlichen Primaten durch verstärkte Absorption [82].

Das Prodrug MMF ist ein weißes, kristallines Pulver, sehr schwer löslich in Wasser (43 µg/ml bei pH 7,4; Raumtemperatur); die Löslichkeit nimmt im sauren Medium zu (4,27 mg/ml bei pH 3,6). Die Säure/Base-Eigenschaften stellen sich in einem  $pK_a$ -Wert von 5,6 für die Morpholinogruppe und einem  $pK_a$ -Wert von 8,5 für die Phenolgruppe dar [7, 141]. Der Verteilungskoeffizient  $V_K$  in 1-Octanol/wässriger Puffer pH 7,0 beträgt 2,95 [186], der  $V_K$  in 1-Octanol/GBR-Puffer pH 7,4 wurde zu 23,41 [202] bestimmt. MMF ist bei 25°C und atmosphärischem Druck stabil. Durch Wärme und Peroxide wird der Abbau von MMF zum Hauptspaltungsprodukt MPA katalysiert [82]. Der aktive Arzneistoff MPA ist ebenfalls schwer löslich in Wasser (63,9 µg/ml), der  $V_K$  in 1-Octanol/GBR-Puffer pH 7,4 wurde zu 3,73 [202] ermittelt.

Als Handelspräparat existiert Cellcept<sup>®</sup>, welches oral oder intravenös verabreicht wird.

### III.3.3.2. Pharmakologie

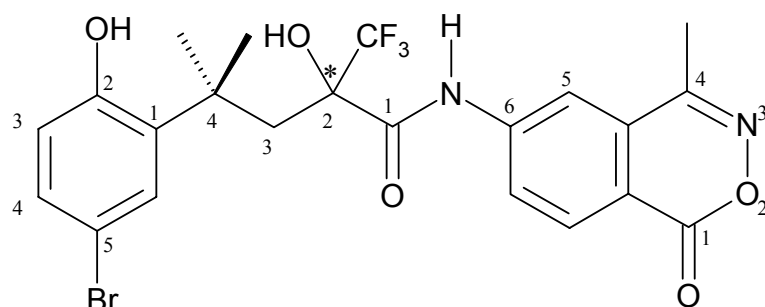
Mycophenolatmofetil (MMF) ist ein Lymphozytenhemmstoff, der nach oraler oder intravenöser Gabe rasch resorbiert und zu Mycophenolsäure (MPA), dem aktiven Metaboliten, metabolisiert wird. MPA ist ein selektiver, nicht-kompetitiver und reversibler Hemmer der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Dadurch erfolgt eine Hemmung der de-novo-Synthese der Guanotin-Nucleotidsynthese ohne Einbau in die DNA (Hemmung bewirkt einen Nucleotidmangel in den Zellen, der die Proliferationsrate verlangsamt). Da Lymphozyten stärker als andere Zelltypen auf den de-novo-Syntheseweg als auf den Wiederverwertungstoffwechsel angewiesen sind, wirkt MPA bzw. MMF in diesen stärker zytostatisch als in anderen Zellen. Auf diese Weise werden die Lymphozyten durch eine langsame Proliferationsrate und Veränderungen der Oberflächenglykolisierung der Adhäsionsmoleküle in ihrer Fähigkeit geschwächt, Allotransplantate und Organtransplantate zu erkennen und zu beseitigen [9, 244].



**Abb. 8: Ablauf der Immunkaskade mit Angriffsorten von Cyclosporin und Mycophenolat-mofetil; nach [179]; Doppelstrich: Hemmung durch MMF**

Allerdings kann MMF direkt nach peroraler Gabe Nebenwirkungen, wie Diarrhöe, Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen, verursachen. Nach längerer Anwendung kann MMF auch zu Myelotoxizität (Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie, Panzytopenie), Sepsis, Neurotoxizität (Tremor, Schwindel) führen sowie zu Stoffwechselwirkungen (pathologische Glucosetoleranz bis Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Hyperkaliämie, Hypophosphatämie). Weiterhin ist es möglich, dass ein arterieller Hypertonus auftritt oder Infektionen (viral, bakteriell, mykotisch, protozoal) auftreten [211, 244].

### III.3.4. ZK 216771



ZK 216771 ( $C_{22}H_{20}BrF_3N_2O_5$ ;  $M_r = 529,307$ ) = (+)-4-(5-Brom-2-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-4-methyl-N-(4-methyl-1-oxo-1H-2,3-benzoxazin-6-yl)-2-(trifluormethyl) pentanamid

\*Chiralität noch nicht aufgeklärt

ZK 216771 ist gut löslich in organischen Lösungsmitteln, wie DMSO, Ethanol, Methanol und Ethylacetat. Die Wasserlöslichkeit beträgt 7,4 mg/l bei pH 7,4 in 0,05 M Phosphatpuffer bei einer Temperatur von 37° C. Der Verteilungskoeffizient  $V_K$  (pH = 7,4) wurde von SCHERING experimentell durch HPLC (Säule: Sphärisorb ODS 2, Material: 3  $\mu$ m, Durchmesser: 4,6 mm, 6 cm lang; Mobile Phase: MeOH/ NaOAc pH 7,0 (75 : 25)) bestimmt und beträgt 316,2 (log  $V_K = 2,5$ ). Der Schmelzpunkt liegt bei 237-239°C.

**Tabelle 8: Stabilität von ZK 216771 in 0,05 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) bei 37°C**

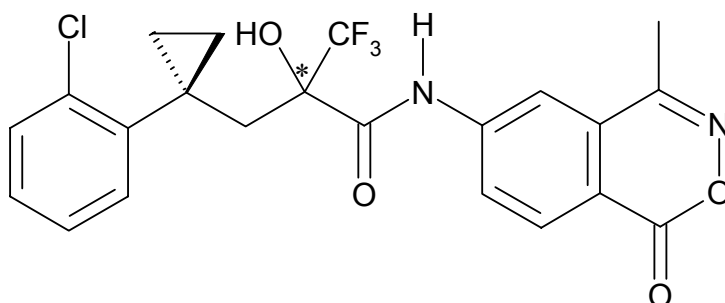
Zeit [h]	Abbaurrate [%]
1	5
2	11
24	33

Stabilitätsuntersuchungen von ZK 216771 in gepufferter Lösung von pH 7,4 wurden ebenfalls von SCHERING durchgeführt (Tabelle 8).

In 0,01 N Salzsäure (pH = 2) erwies sich ZK 216771 über 24 h als 100%ig stabil.

Eine hydrolytische Spaltung führt durch Spaltung der Säureamidstruktur zur freien Säure und zum primären Amin. Bekannt ist weiterhin die basenkatalysierte Hydrolyse des Benzoxazinonringes [198].

### III.3.5. ZK 247756



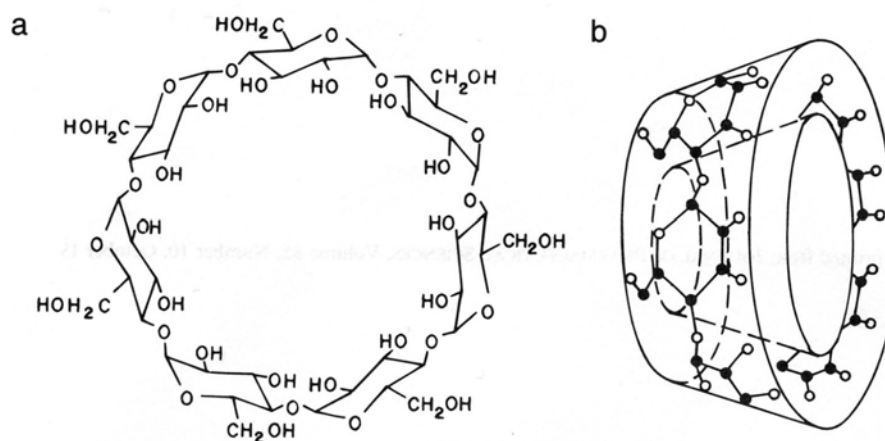
ZK 247756 ( $C_{22}H_{18}ClF_3N_2O_4$ ;  $M_r = 466,8412$ ) = (+)-3-[1-(2-Chlorphenyl)cyclopropyl]-2-hydroxy-N-(4-methyl-1-oxo-1H-2,3-benzoxazin-6-yl)-2-(trifluormethyl)propanamid

\*Chiralität noch nicht aufgeklärt

Die Wasserlöslichkeit von ZK 247756 beträgt 2,6 mg/l (pH 7,4) in 0,05 M Phosphatpuffer bei 37° C. Die Substanz ist leicht löslich in Ethanol.

## III.4. Hilfsstoffe / Trägersysteme

### III.4.1. Cyclodextrine



**Abb. 9: Chemische Struktur (a) und zylindrische Gestalt (b) eines  $\beta$ -Cyclodextrin-Moleküls**

In der Ph.Eur. existiert nur Betadex ( $\beta$ -Cyclodextrin) als Cyclo- $\alpha$ -(1-4)-D-hepta-glucopyranosid der Summenformel  $[C_6H_{10}O_5]_7$ ;  $M_r = 1135$ ).

### III.4.1.1. Cyclodextrine allgemein

Obwohl Cyclodextrine (CDe) als Hilfsstoffgruppe in der Pharmazie erst neuerdings Relevanz haben, sind sie als chemische Verbindungen schon seit über 100 Jahren bekannt [118]. Der Anfang der CD-Chemie lässt sich bis in den ersten Teil des 20. Jahrhunderts zurückverfolgen, und das erste Patent auf CDe und seine Komplexe wurde 1953 erteilt [62]. Jedoch konnten bis 1970 aufgrund der sehr hohen Produktionskosten nur kleine Mengen an CDen hergestellt werden, was eine breit gefächerte Anwendung allgemein verhinderte. Neueste biotechnologische Fortschritte führten zur entscheidenden Verbesserung der CD-Gewinnung und somit zur Senkung der Produktionskosten. Mittlerweile sind hochreine CDe und CD-Derivate verfügbar, die auch als pharmazeutische Hilfsstoffe geeignet und von Interesse sind. Ihre pharmazeutische Verwendung dient in erster Linie der Verbesserung der Wasserlöslichkeit und der Stabilität von Wirkstoffen sowie der Modifizierung von deren Bioverfügbarkeit. Weiterhin können CDe Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen oder Arzneistoff-Hilfsstoff-Interaktionen verhindern, gastro-intestinale oder auch okuläre Irritationen reduzieren sowie unangenehmen Geschmack oder Geruch überdecken [118].

**Tabelle 9: Einige Charakteristika der nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine und ausgewählter Derivate**

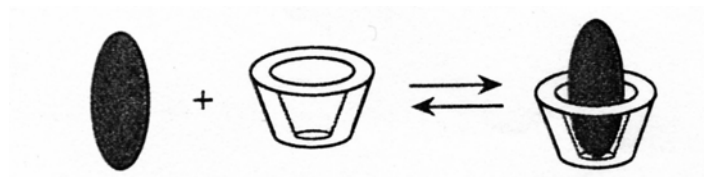
Cyclodextrin	Glucopyranose-Einheit	Durchmesser [Å] (Zentrale Kavität)	Relative Molekülmasse	$c_s$ [g/100ml]; 25°C
$\alpha$ -CD	6	4,7-5,3	~972 [118]	14,5 [237]
HP- $\alpha$ -CD <sup>1</sup>			~1238 [236]	60 [236]
$\alpha$ -CD-Pol			3-5000 [39]	>33 [39]
CM- $\alpha$ -CD-Pol			6-8000 [39]	>20 [39]
$\beta$ -CD	7	6,0-6,5	~1135 [118]	1,85 [118]
HP- $\beta$ -CD <sup>1</sup>			~1400 [235]	50 [235]
$\gamma$ -CD	8	7,5-8,3	~1297 [118]	23,2 [118]
HP- $\gamma$ -CD <sup>1</sup>			~1576 [234]	80 [235]; >150 [234]

<sup>1</sup>molarer Substitutionsgrad: 0,6 (HP- $\alpha$ -CD); 0,58-0,73 (HP- $\beta$ -CD); 0,5-0,7 (HP- $\gamma$ -CD)  
 $c_s$  = Sättigungslöslichkeit in Wasser

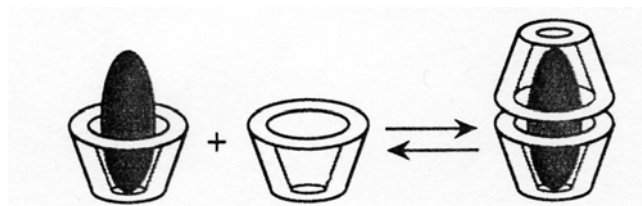
CDe sind zyklische Oligosaccharide, die aus 1,4- $\alpha$ -glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten bestehen. Sie besitzen einen relativ apolaren zentralen Hohlraum und eine

hydrophile äußere Oberfläche. Da sich die Bindungen zwischen den Glucopyranose-Einheiten nicht frei drehen können, sind CDe keine zylindrischen, sondern kegelförmige Moleküle. Die primären Hydroxylgruppen befinden sich auf der engeren Seite des Zylinders, die sekundären Hydroxylgruppen auf der weiteren Seite (Abb. 9).

Die am weitesten verbreiteten CDe sind  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD. Sie bestehen aus sechs, sieben bzw. acht Glucopyranose-Einheiten (Tabelle 9). Die Polarität des Hohlraums, in dem die Etherbrücken und sekundären OH-Gruppen vorherrschen, wurde mit derjenigen einer wässrig-ethanolischen Lösung verglichen [118]. Diese vergleichsweise apolare Mikroumgebung macht es für passende, lipophile Moleküle bzw. Molekülteile möglich, in der Kavität „fixiert“ zu werden und so Einschlussverbindungen zu bilden. Diese werden über Nebenvalenzbindungen stabilisiert. In wässriger Lösung befinden sich freie Arzneistoffmoleküle im Gleichgewicht mit komplexierten (Arzneistoff/CD-Komplex) Molekülen.



**Abb. 10: Gleichgewicht: Wirtsfreier Arzneistoff und Gastmolekül (Cyclodextrin) mit ihrem 1:1-Komplex; nach [118]**



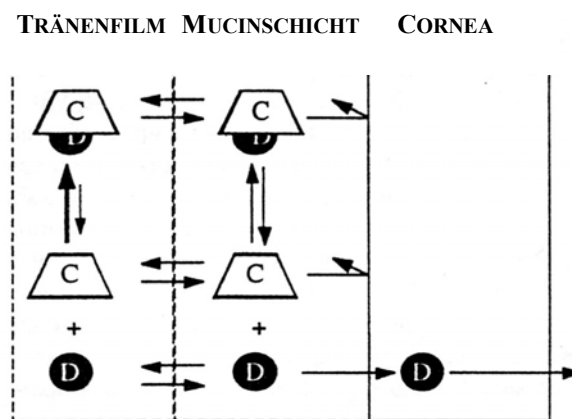
**Abb. 11: Gleichgewicht: Freier Arzneistoff und Cyclodextrin mit ihrem 1:2-Komplex; nach [118]**

Die meisten pharmazeutisch verwendeten Substanzen bilden 1:1-Komplexe mit CDen (Abb. 10). In Abhängigkeit von Struktur und Eigenschaften der Arzneistoffe sowie vom ausgewählten CD sind auch Komplexe höherer Ordnung möglich (Abb. 11).

### III.4.1.2. Cyclodextrine in Ophthalmika

Zur Anwendung von CDen in der Ophthalmologie wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Experimenten und Studien durchgeführt [47, 122, 127, 171, 214]. CDe werden ophthalmologisch eingesetzt, um die Wasserlöslichkeit schwerlöslicher Arzneistoffe zu erhöhen (und damit z.T. eine topische Applikation überhaupt erst zu ermöglichen), um die Stabilität von Arzneistoffen in wässriger Lösung zu verbessern, um die Verfügbarkeit am Auge zu optimieren und um lokale okulare Reizungen zu vermindern oder auszuschließen [122, 127].

Von herausragendem Interesse ist der Einfluss von ausgewählten CDen auf die okulare Arzneistofffreisetzung. Die okulare Barriere für die Arzneistoffpermeation in das Auge besteht aus vorrangig lipophilen Membranen (Cornea, Conjunctiva, Sclera). Der Außenseite der Cornea liegt jedoch eine hydrophile Mucinschicht auf, die von dem wässrigen Tränenfilm überzogen ist. Im Idealfall sollte das Arzneistoffmolekül sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften aufweisen, um die einzelnen Barrieren (Tränenfilm→ Epithel→ Stroma→ Endothel) des Auges überwinden zu können [127].



**Abb. 12: Der vermutliche Mechanismus der Arzneistoffpenetration von wässrigen, cyclodextrinhaltigen Augentropfen; nach [122]**

Die bevorzugten Transportmechanismen sind, je nach physikalisch-chemischen Parametern des Wirkstoffs, die passive und die Porendiffusion. Obwohl durch Komplexbildung mit CDen die Wasserlöslichkeit vieler lipophiler Moleküle erheblich zu verbessern ist, resultiert daraus nicht unbedingt ein direkter Einfluss auf die Membranpermeabilität. Die CD-Moleküle sind verhältnismäßig groß (vgl. Tabelle 9) und deshalb in der Regel nicht prädestiniert, biologische Membranen zu permeieren [117, 127, 171]. Da sie aber als Lösungsvermittler für hydrophobe



Moleküle fungieren, sind sie in der Lage, die Verfügbarkeit dieser Arzneistoffe auf der Membranoberfläche zu erhöhen. Nach dem Modell in Abb. 12 verläuft der Arzneistofftransport durch die Mucinschicht diffusionskontrolliert, wohingegen der Transport durch die Membran (hier Cornea) membrankontrolliert ist.

Ob durch CD-Komplexierung die okulare Verfügbarkeit eines Arzneistoffs erhöht oder vermindert wird, ist erstens von der Polarität des Arzneistoffs (Verteilungskoeffizient) abhängig und zweitens von der verwendeten CD-Konzentration. Zum Beispiel konnte an dem hydrophoben Molekül Arachidonylethanolamid [91] gezeigt werden, dass bei einer niedrigen Konzentration von HP- $\beta$ -CD, solange der Arzneistoff noch in Form einer Suspension vorliegt, der Flux (s. Untersuchungen, IV.3.1.2) mit steigender CD-Konzentration zunimmt. Im Bereich höherer CD-Konzentrationen hingegen, wenn der Arzneistoff vollständig in Lösung vorliegt, nimmt der Flux mit zunehmender CD-Konzentration ab.

Tabelle 10 führt bisher untersuchte Einflüsse unterschiedlicher CD-Derivate auf okular angewendete Arzneistoffe auf.

**Tabelle 10: Einfluss von Cyclodextrinen auf die Eigenschaften einiger okular angewendeter Arzneistoffe**

Arzneistoff	Cyclodextrin	Effekt	Referenz
Acetazolamid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit↑ Bioverfügbarkeit <sup>M</sup> ↑	[98, 119, 128]
Amphotericin B	$\gamma$ -CD	Löslichkeit↑	[170]
Anandamid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit↑ Stabilität↑ Corneale Penetration <sup>K</sup> ↑	[91] [151]
Chloramphenicol	$\beta$ -CD	Löslichkeit↑	[1]
Cyclosporin	$\alpha$ -CD	Löslichkeit↑ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> ↑	[96] [34]
Delta9-tetrahydrocannabinol	$\alpha$ -CD	Transcornealer Flux <sup>K</sup> <i>in vitro</i>	[99]
Dexamethason	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit↑ Stabilität↑ Bioverfügbarkeit <sup>M</sup> ↑	[121, 229] [229] [107, 191, 229]
Diclofenac	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit↑ Corneale Penetration↑	[176]

Arzneistoff	Cyclodextrin	Effekt	Referenz
Dipivefrin	HP- $\gamma$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Stabilität $\uparrow$ Corneale Penetration $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[221]
	SBE7- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Stabilität $\uparrow$ Corneale Aufnahme <sup>K</sup> $\downarrow$	[89]
Ethoxyzolamid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$	[119]
Hydrocortison	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\downarrow$	[12, 40]
Methazolamide	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>M</sup> 0	[73]
Pilocarpin	$\alpha$ -CD	Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$ Corneale Penetration <sup>R</sup> $\uparrow$	[101] [208]
	HP- $\beta$ -CD	Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[61]
	HP- $\beta$ -CD	Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> 0 Corneale Penetration 0	[208]
	SBE4- $\beta$ -CD	Stabilität $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> 0	[92]
Pilocarpin-Prodrug	HP- $\beta$ -CD	Augenreizung <sup>K</sup> $\downarrow$	[94]
	SBE4- $\beta$ -CD	Augenreizung <sup>K</sup> $\downarrow$	[90]
	SBE7- $\beta$ -CD	Augenreizung <sup>K</sup> $\downarrow$	[217]
Prostaglandine	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[242]
Thalidomid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Corneale Penetration <sup>R</sup> $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[209]
1,3,4-Thiadiazol-2-sulfonamid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[134]
Tropicamid	HP- $\beta$ -CD	Löslichkeit $\uparrow$ Bioverfügbarkeit <sup>K</sup> $\uparrow$	[30]

$\uparrow$  = gesteigerter Effekt,  $\downarrow$  = verminderter Effekt, 0 = kein Effekt;  
Bioverfügbarkeit<sup>K</sup>: Kaninchen, <sup>M</sup>: Mensch, <sup>R</sup>: Rind

In der Ophthalmologie werden CDe dazu verwendet, schwerlösliche Antibiotika (z.B. Amphotericin B [170] und Chloramphenicol [1]), Carboanhydrasehemmer (z.B. Acetazolamid und Ethoxyzolamid [119, 120, 128]) oder Nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B.

Diclofenac-Na) [176, 221], in Lösung zu bringen.

Studien unserer Arbeitsgruppe [209] zeigten eine gegenüber einer Suspension verbesserte Bioverfügbarkeit des immunsuppressiven, lipophilen Arzneistoffs Thalidomid im Kaninchenauge bei Verwendung einer wässrigen 0,04% Thalidomid/ 12,5% HP- $\beta$ -CD-Augentropfenlösung. Darüber hinaus wurde die HP- $\beta$ -CD-Formulierung vom Kaninchenauge gut toleriert. CDE in Ophthalmika sind auch in der Lage, Irritationen am Auge zu vermindern [90, 94, 217]. Über die Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit einer wässrigen Dexamethason (0,1%)/ HP- $\beta$ -CD (10%)-Augentropfenformulierung liegen schon Untersuchungen am Menschenauge vor [191].

Auch hydrophile Arzneistoffe wurden im Zusammenhang mit CDen in ophthalmologischen Zubereitungen getestet. Die Stabilität von Pilocarpinhydrochlorid (P), das normalerweise aus Stabilitätsgründen in wässrigen Handelspräparaten auf pH 4-5 eingestellt wird, konnte durch Komplexierung mit SBE4- $\beta$ -CD verdoppelt werden [92].

Über den Einfluss der Komplexierung von P mit CDen auf die okulare Verfügbarkeit *in vivo* existieren unterschiedliche Angaben in der Literatur. FREEDMAN et al. [61] berichteten über eine erhöhte Bioverfügbarkeit (Mensch) von P (Konzentration 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) aus einer 5%igen HP- $\beta$ -CD Lösung im Vergleich zu einer CD-freien P-Lösung. Als Ursache diskutieren sie eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen ionisierter und nicht-ionisierter Form zugunsten der Letzteren, d.h. der  $\text{pK}_a$ -Wert sinkt durch CD-Komplexierung. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beeinflusste SBE4- $\beta$ -CD in niedrigen Konzentrationen die Bioverfügbarkeit (Kaninchen) von P nicht, in höheren Konzentrationen wird diese sogar vermindert [92]. Ähnliche Ergebnisse erzielte dieses Forscherteam mit HP- $\beta$ -CD [92].

Studien unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die *In-vitro*-Permeation von P durch isolierte Rindercornea in Gegenwart von HP- $\beta$ -CD gegenüber der CDfreien Referenz reduziert war, was mit einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffs aus dem CD-Assoziat erklärt wird [208]. Weiterhin wurde für  $\alpha$ -CD *in vitro* eine gesteigerte okulare Verfügbarkeit von P gefunden und auf die bekannten membranschädigenden Effekte [96, 227] von  $\alpha$ -CD zurückgeführt.

Seit 2001 ist das erste Handelspräparat mit CD in Form von Augentropfen auf dem Markt. Das Präparat heißt „Voltaren Ophtha<sup>®</sup>CD“ und wird von Novartis Ophthalmics (Ciba Vision,

Hettlingen, Schweiz) hergestellt. Es enthält 0,1% Diclofenac-Natrium als Wirkstoff und ist mit 0,005% Benzalkoniumchlorid (BAC) konserviert. Als Hilfsstoffe sind Propylenglykol und HP- $\gamma$ -CD aufgeführt. Über die eingesetzte Konzentration an HP- $\gamma$ -CD gibt es keine Angaben [233]. Am gesunden Kaninchenauge konnte gezeigt werden, dass  $^{14}\text{C}$ -markiertes Diclofenac die Maximalkonzentration in der Cornea und in der Conjunctiva 30 min nach der Applikation erreicht. Der größte Teil des Wirkstoffs wurde in diesen beiden Geweben sowie in der Chorioidea gefunden. Die Elimination erfolgte rasch und war nach 6 h beinahe vollständig [233].

Eine klinische Studie von MESTER et al. [140] berichtet von signifikant weniger okularen Irritationen bei einer Behandlung mit der Formulierung Voltaren Ophtha<sup>®</sup> CD im Vergleich zu Voltaren Ophtha<sup>®</sup> (0,1% Diclofenac-Natrium, konserviert mit 0,004% Thiomersal, enthält kein CD).

In vorhergehenden Untersuchungen von SZENTE et al. [221] wird berichtet, dass HP- $\gamma$ -CD die Inkompatibilität zwischen Diclofenac und BAC unterdrückt und zu einer verbesserten Langzeitstabilität in wässriger Lösung bei einem neutralen pH führt.

#### III.4.1.3. Toxikologie der Cyclodextrine

Alle entsprechenden Toxizitätsstudien haben gezeigt, dass peroral verabreichte CDe vom Gastrointestinaltrakt nicht aufgenommen werden [86]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD und Maltosyl- $\beta$ -CD – selbst nach parenteraler Applikation – als nicht toxisch eingeschätzt werden können. Allerdings ergaben Toxizitätsstudien, dass  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD und methylierte  $\beta$ -CDe für die parenterale Anwendung ungeeignet sind.

Nach topischer Anwendung einer CD-haltigen Augentropfenlösung gelangen CDe schnell von der Augenoberfläche über die Nase in den Gastrointestinaltrakt. Werden zwei Tropfen (à ca. 50  $\mu\text{l}$ ) einer isotonen 10%igen CD-Lösung dreimal täglich in beide Augen appliziert, beträgt die Gesamtmenge an CD ungefähr 30 mg. Aufgrund dieser geringen Menge kann eine systemische Toxizität nach ophthalmogischer Anwendung so gut wie ausgeschlossen werden [122].

Eine okulare Irritation oder sogar irreversible Schädigung am Auge kann hingegen (je nach verwendetem CD) nicht ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass eine geringe Menge an nicht- oder niedrigsubstituiertem CD in die Cornea, Sclera oder andere Gewebe des Auges

penetriert. Beschrieben werden nachweisbare Penetrationsraten für das teilweise lipophile CD-Derivat Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) sowie für das kleine, native Molekül  $\alpha$ -CD [207]. Jedoch sind CDe partiell in der Lage, lipophile Komponenten, wie z.B. Cholesterol und Phospholipide, durch Komplexbildung aus den okularen Membranen zu „extrahieren“. Die Fähigkeit der CDe, mit biologischen Membranen zu interagieren, ist jedoch deutlich reduziert, wenn deren Kavität bereits mit einem lipophilen Molekül besetzt ist.

Das am häufigsten angewendete CD in wässrigen Augentropfen ist HP- $\beta$ -CD [127]. Zahlreiche Studien bei Versuchstieren und am Menschen konnten die sehr gute Verträglichkeit dieses  $\beta$ -CD-Derivats bestätigen [127]. Die dreimal tägliche Applikation eines Tropfens einer 18%igen HP- $\beta$ -CD Lösung am Menschen während 28 Tagen wurde gut toleriert [129]. *In-vivo*-Studien am Kaninchen zeigten, dass auch SBE- $\beta$ -CD in wässrigen Augentropfen gut verträglich ist [90, 94]. Andere CDe und CD-Derivate, die zur topischen Anwendung in der Ophthalmologie als geeignet angesehen werden, sind Maltosyl- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\gamma$ -CD und in niedrigen Konzentrationen  $\alpha$ -CD sowie „Randomized methylated  $\beta$ -Cyclodextrin“ (RM- $\beta$ -CD) [122]. Allerdings liegen hierzu in der Literatur bisher nur wenige Daten vor.

DUNCKER et al. [49] führten eine *In-vitro*-Studie durch, die sich mit dem Hilfsstoff HP- $\beta$ -CD und dessen Auswirkung auf das corneale Endothel beschäftigt. Diese Untersuchung steht in gewisser Weise im Widerspruch zu den zuvor genannten Daten. An 190 Schweinecorneae wurden Veränderungen im cornealen Endothel nach Einwirkung dieses CD-Derivats untersucht. Veränderungen in der Zelldichte und in der Zellmorphologie wurden mittels Lichtmikroskop und Rasterelektronenmikroskopie beobachtet. Die Zelldichte blieb bei einer Konzentration von 0,1-1% HP- $\beta$ -CD konstant. Bei 10% HP- $\beta$ -CD zeigten sich jedoch schwerwiegende Schädigungen des Endothels.

#### III.4.1.4. Mikroemulsionen

Mikroemulsionen (MEen) werden in der vorliegenden Arbeit als Carriersysteme für den neuen Wirkstoff ZK 247756 genutzt. Es sind allgemein Systeme, die aus Wasser, einem Lipid, einem Tensid sowie i.d.R. einem Cotensid bestehen. Sie liegen als thermodynamisch stabile, einphasige, transparente oder schwach opaleszierende, sich spontan bildende, flüssige Systeme vor [213, 232]. MEen gehören wie Nanokapseln, Solubilisate und Liposomen zu den

hochdispersen Systemen [28].

Für die ophthalmologische Anwendung am Auge sind Kennzahlen, wie Brechungsindex, Viskosität, pH-Wert, physiologische Verträglichkeit (charakterisiert durch den HET-CAM-Test bzw. den Draize-Test [78]) sowie Sterilisierbarkeit, entscheidend.

Zielstellungen bei topischer Anwendung am Auge sind verbesserte Bioverfügbarkeit, verminderte Applikationsfrequenz durch einen möglichen Retardeffekt sowie folglich eine Verminderung der Arzneistoffnebenwirkungen.

In unserer Arbeitsgruppe gab es zahlreiche Untersuchungen auf diesem Gebiet [78, 102, 104, 113, 206]. SIEBENBRODT und KEIPERT [206] entwickelten okulare MEen (Bestandteile: Triacetin, Synperonic® L 64, Propylenglykol, Wasser) und untersuchten die *In-vitro*-Liberation von Diclofenac, Indometacin und Chloramphenicol aus letzteren. Die Arzneistoffliberation aus den MEen war im Vergleich mit entsprechenden Pufferlösungen stark verzögert [206]. Weiterhin konnte in einer Studie von KEIPERT und SCHULZ [102] eine verminderte *In-vitro*-Freigabe aus einer Pilocarpin-ME (Bestandteile: Isopropylmyristat, Wasser, Propylenglykol, Saccharoseestertensidgemisch) gegenüber einer wässrigen Standardlösung beobachtet werden.

Die physiologische Verträglichkeit der entwickelten MEen zur okularen Anwendung war vorwiegend positiv zu bewerten [78, 102, 206]. Auch die chemische Stabilität der Arzneistoffe in den MEen sowie die physikalische Stabilität der MEen selbst (Langzeit-Stabilitätstests) zeigte sich für die pharmazeutische Anwendung geeignet [102, 206].

#### III.4.1.5. Sonstige Hilfsstoffe

Die im Folgenden aufgeführten Hilfsstoffe dienen der Konservierung der Augentropfen (BAC, Theoretische Grundlagen, III.4.1.5.1) oder waren Bestandteile der verwendeten Mikroemulsion (Ergebnisse und Diskussion, V.3.2.1, Tabelle 30).

##### III.4.1.5.1. Benzalkoniumchlorid

*Benzalkoniumchlorid ( $C_{17-27}H_{30-50}ClN$ ;  $M_r = 354,0$ , berechnet als  $C_{22}H_{40}ClN$ ), ein Gemisch von Alkylbenzoldimethylammoniumchloriden, deren Alkylteil aus  $C_8$ - $C_{18}$ -Ketten besteht, ist in der Eur. Ph. NT 2001 und in der USPXXVI aufgeführt.*

Benzalkoniumchlorid (BAC), eine quartäre Ammoniumverbindung (Quat) oder auch Invertseife liegt als weißes oder gelblichweißes, sehr bitter schmeckendes, amorphes,

hygroskopisches Pulver oder als gelartige Masse [44] vor. Quats sind, wie echte Seifen, grenzflächenaktive Substanzen.

BAC wird in erster Linie als Desinfektionmittel für Flächen und Instrumente eingesetzt sowie als Hände- und Hautantiseptikum. Außerdem gehört es international zu den am häufigsten eingesetzten Konservierungsmitteln in Ophthalmika. In Augentropfen wird es zumeist 0,01%ig eingesetzt [28]; gebräuchliche Konzentrationen allgemein sind 0,002-0,02% [232]. Das Wirkungsspektrum umfasst die grampositiven und die weniger empfindlichen gramnegativen Keime. Gegen Pilze und Viren ist BAC wenig wirksam. Bazillensporen sind resistent.

Der Wirkungsmechanismus beruht auf Anlagerung und Adsorption der Verbindung an der Oberfläche der Mikroorganismen, was zur Zerstörung des Aufbaus der Zytoplasmamembran führt. Entscheidend für die Wirkung sind der quartäre Stickstoff und eine oder mehrere lipophile Seitenketten, die mindestens acht Kohlenstoffatome enthalten müssen. Die hydrophoben Seitenketten sind für die Wechselwirkung mit den Bakterienoberflächen verantwortlich. Sie können in Membranen penetrieren und diese desintegrieren [69], so dass es zum Austritt von zytosolischem Material kommen kann. Die kationischen Köpfe können durch Ladungsneutralisation die Denaturierung von Proteinen bewirken.

#### III.4.1.5.2. Rizinusöl

*Rizinusöl ist das aus den Samen von Ricinus communis L. durch Pressen ohne Wärmezufuhr erhaltene Öl und in der Eur. Ph. aufgeführt.*

Rizinusöl (Christuspalmöl, Castoröl) wird aus den geschälten Samen von Ricinus communis L. durch Pressen ohne Wärmezufuhr (Kaltpressung: max. 40°C) gewonnen [232] und dann mit Wasser ausgekocht [28]. Das Öl ist klar, blassgelb, dickflüssig, fast geruchs- und geschmacksneutral (milder, später kratzender Geschmack [54]).

Rizinusöl enthält in den Triacylglycerolen 85 bis 90% Rizinolsäure ((12R)-12-Hydroxy-octadec-9Z-ensäure, (12R)-12-Hydroxy-ölsäure), besonders in Form des Tririzinoloylglycerols. Es ist gut haltbar und im Gegensatz zu anderen Ölen sehr viskös, mit absolutem Ethanol und Essigsäure mischbar, zu 30% löslich in 90%igem Ethanol und fast unlöslich in Benzin. Rizinusöl wird wegen seiner Löslichkeit in Ethanol auch als Zusatz zu Dermatika und Kosmetika eingesetzt. Außerdem dient Rizinusöl als Arzneiträger, z.B. für Augenarzneilösungen und Injectabilia [223].

Ölige Lösungen, die okular angewendet werden (Rizinusöl, Erdnussöl) besitzen eine lange Kontaktzeit an der Cornea und werden nicht ausgewaschen. Allerdings haben sie den Nachteil einer Sichttrübung. Die Arzneimittelresorption erfolgt langsamer, so dass eine Erzielung von Depoteffekten möglich ist. Für ölige Zubereitungen sind Isotonie und Isohydrie bedeutungslos [232]. Ölige Zubereitungen bilden keinen Nährboden für Mikroorganismen und sind als keimarm anzusehen. International ist jedoch eine Heißluftsterilisation gebräuchlich; eine Konservierung ist nicht erforderlich [232].

#### III.4.1.5.3. Polysorbat 80 (Tween® 80)

*Polysorbat 80 (Polysorbatum 80) ist als Monographie in der Eur. Ph. aufgeführt.*

Polysorbat 80 ist ein Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonooleat). Laut Eur. Ph. handelt es sich bei dem nichtionogenen O/W-Emulgator um ein Gemisch von Partialestern des Sorbitols und seiner Anhydride mit Ölsäure, das mit etwa 20 Mol Ethylenoxid pro Mol Sorbitol bzw. Sorbitan copolymerisiert wurde. Tween® 80 ist löslich in Wasser und Ethanol, unlöslich in Pflanzen- und Mineralölen, die HLB beträgt 15,0 und die Viskosität (25°) 375-480 mPas [14].

Tween® 80 wird in der Pharmazie als nicht-ionischer O/W-Emulgator in Salben und Cremes, als Lösungsvermittler (z.B. für Aromen, ätherische Öle, Vitaminöle, wasserunlösliche Arzneistoffe) sowie als Netzmittel (z.B. in Suspensionen) verwendet [27]. Polysorbat bewirkt die Lyse der humanen Erythrozyten in Konzentrationen von > 0,012% [57].

#### III.4.1.5.4. Cremophor® RH 40

Handelsbezeichnungen für verschiedene Typen von Glycerin-Polyethylenglykoxystearat. Hauptbestandteile der Cremophor®-Marken sind Fettsäureglycerinpolyglykolester und Fettsäurenpolyglykolester, welche den hydrophoben Anteil des Produktes darstellen. Der hydrophile Teil besteht aus Polyethylenglykolen und Glycerolethoxylat. Die Produkte sind universell anwendbare Lösungsvermittler für ätherische Öle, Riechstoffe, fettlösliche Vitamine und andere hydrophobe Stoffe. Die Cremophor®-Produkte lösen sich klar in Wasser, Ethyl-, iso-Propyl-, n-Propylalkohol, Essigester, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Trichlorethylen, Benzol, Toluol und Xylol. Cremophor® RH 40 ist eine weiße Paste mit 100% Aktivsubstanz, deren HLB 14-16 ist [57].

Bei den Schleimhautverträglichkeitsprüfungen am Kaninchenauge wurden 30%ige wässrige



Lösungen von Cremophor<sup>®</sup> RH 40 ohne Reizwirkung vertragen [57].

#### III.4.1.5.5. Macrogol 300/400

*Macrogol 300/400 ist als Monographie in der Eur. Ph. aufgeführt.*

Macrogol 300/400 (früher: Polyethylenglykol 300/400) ist ein Gemisch von Polymeren mit der allgemeinen Formel  $\text{H}-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$  und der mittleren Molekülmasse von etwa 300/400. Es ist eine klare, viskose, hygroskopische, farblose Flüssigkeit; mischbar mit Wasser, sehr leicht löslich in Aceton, Dichlormethan und Ethanol, praktisch unlöslich in Ether, fetten Ölen und Mineralölen. Macrogole werden u.a. als Träger für schwerlösliche Wirkstoffe bzw. als Resorptionsvermittler angewendet [13].

## IV.        UNTERSUCHUNGEN

### IV.1.    Löslichkeitsversuche

Löslichkeitsversuche waren in der vorliegenden Arbeit Voraussetzung, um die schwerlöslichen Arzneistoffe PIN-Base, MMF, MPA, ZK 216771 und ZK 247756 in eine bevorzugt wässrige Lösung bzw. Rezeptur zu bringen und um die vorgesehenen Untersuchungen durchführen sowie eine okulare Applikation ermöglichen zu können. Tabelle 11 zeigt die Wasserlöslichkeiten der genannten Arzneistoffe.

PIN lag als einziger der zu untersuchenden  $\beta$ -Blocker als lipophile Base vor und sollte der Versuchsplanung entsprechend bei pH 7,4 mittels CDen in Lösung gebracht werden. Da eine ungeladene Base im Vergleich zum meist besser löslichen Salz die Cornea leichter permeiert, war bewusst auf Salzbildung des Ausgangsstoffs zu verzichten. Stattdessen sollte die Permeation durch isolierte Schweinecornea aus einem PIN/CD-Assoziat untersucht werden (Ergebnisse und Diskussion, V.1.2.4).

Mit dem  $\beta$ -Blocker PIN dienten Löslichkeitsversuche mit wässrigen CD-Lösungen gleichzeitig dazu, Aussagen über das Entstehen möglicher Einschlussverbindungen zu erbringen (Ergebnisse und Diskussion, V.1.2.6.1).

**Tabelle 11: Schwerlösliche Arzneistoffe**

Arzneistoff	Sättigungslöslichkeit in Wasser [ $\mu\text{g/ml}$ ] bei RT
Pindolol-Base (PIN)	160
Mycophenolsäure (MPA)	63,9
Mycophenolatmofetil (MMF)	43,0
ZK 216771	7,4
ZK 247756	2,6

RT:  $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beschreiben die Löslichkeit von MMF bzw. MPA in HP- $\beta$ -CD-Lösungen (Verhältnis MMF/MPA ohne CD-Zusatz in GBR pH 7,4: 5,4 : 1 bis 7,6 : 1 [202]). Bei einer Konzentration von 10% HP- $\beta$ -CD konnte für MMF eine

ca. 20fache Löslichkeitsverbesserung gegenüber dem Pufferwert erreicht werden, für MPA eine ca. 3fache [202].

Die extrem schwerlöslichen SEGRA-Verbindungen ZK 216771 und ZK 247756 (Tabelle 11) wurden ebenfalls in wässrigen CD-Lösungen komplexiert (Ergebnisse und Diskussion, V.3.1.1). Um eine therapeutisch relevante Konzentration zu erreichen, waren zusätzliche Maßnahmen (Zusatz von Ethanol, veränderte Herstellungsverfahren, Herstellung einer CDhaltigen Mikroemulsion) erforderlich (Ergebnisse und Diskussion, V.3.2.1).

Die Durchführung der Löslichkeitsversuche erfolgte, indem ein Arzneistoffüberschuss zu CDhaltigen (native CDe, hydroxypropylierte Derivate, (carboxymethyliertes)  $\alpha$ -CD-Polymer) Pufferlösungen gegeben wurde. Die Sättigungskonzentration wurde mittels HPLC aus dem Filtrat bestimmt (Material und Methoden, VI.2.3.2.3).

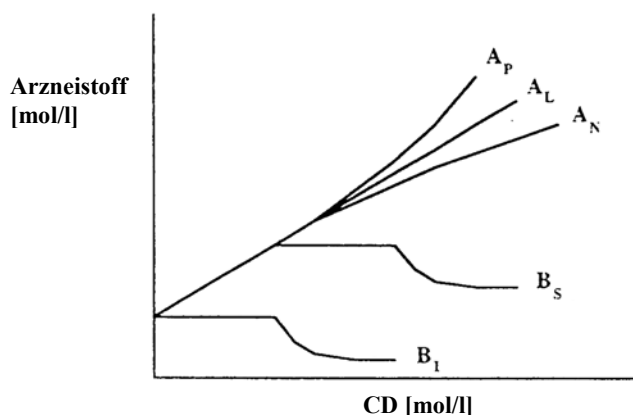
## **IV.2. Bestimmung der Arzneistoff/CD-Komplexierung**

Die am meisten angewandte Methode zur Erfassung der Komplexierung zwischen einem Arzneistoff und einem ausgewählten CD im gelösten Zustand ist die Bestimmung der Arzneistofflöslichkeit in wässrigen CD-Lösungen abgestufter Konzentration. Die Ergebnisse werden in einer sog. Löslichkeitsisotherme (Abb. 13) dargestellt, indem die molare Konzentration des gelösten Arzneistoffs (Ordinate) als Funktion der CD-Konzentration (Abszisse) aufgetragen wird. Gemäß HIGUCHI und CONNORS [80, 81] werden die Löslichkeitsisothermen in A- und B-Typen eingeteilt. Die A-Typen sind charakteristisch für wasserlösliche CDe und lassen auf Bildung löslicher Einschlussverbindungen zwischen Arzneistoff und CD-Derivat schließen. Im Gegensatz dazu beschreiben die B-Typen eher den durch native CDe vermittelten Löslichkeitsverlauf. Sie demonstrieren eine begrenzte Wasserlöslichkeit des gebildeten Komplexes.

Zur Erstellung des Phasenlöslichkeitsdiagramms wird ein Überschuss an Arzneistoff der entsprechenden wässrigen CD-Lösung in steigender molarer Konzentration zugesetzt und die Konzentration eines Arzneistoffs im Gleichgewichtszustand analytisch erfasst. Im  $A_L$ -Diagramm steigt die Löslichkeit linear als Funktion der CD-Konzentration an. Es spiegelt die Bildung eines 1:1-Komplexes zwischen Arzneistoff und CD wider. Die Stabilitätskonstante kann nach Gleichung 1 berechnet werden [88]:

$$K_{1:1} = K_{Stab} = \frac{\tan \alpha}{[c_s] \cdot (1 - \tan \alpha)} \quad (1)$$

$K_{Stab}$  ist die Stabilitätskonstante für einen 1:1-Komplex nach dem  $A_L$ -Typ und  $[c_s]$  die Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffs in Wasser in Abwesenheit von CD bei gegebener Temperatur.



**Abb. 13: Verschiedene Typen von Löslichkeitsisothermen; nach [81]; A: löslicher Komplex;  $A_L$ : linear,  $A_P$  bzw.  $A_N$ : nicht linear bei höherer CD-Konzentration; B:  $B_S$ : Komplex besitzt schlechtere Löslichkeit als das Substrat,  $B_I$ : Komplex fällt nach Erreichen einer Löslichkeitsgrenze aus**

In einer  $A_P$ -Löslichkeitsisotherme nimmt die Löslichkeit des Arzneistoffs bei höheren CD-Konzentrationen stärker zu als bei niedrigen (Abb. 13). In diesem Fall werden 1:1- und 1:2-Komplexe (oder Komplexe höherer Ordnung) gebildet. Die Stabilitätskonstanten für  $A_P$ -Phasenlöslichkeitsdiagramme können nach Gleichung 2 berechnet werden [88]:

$$\frac{([c_0] - [c_s])}{[c_c]} = K_{1:1} \cdot [c_s] + K_{1:1} \cdot K_{1:2} \cdot [c_s] \cdot [c_c] \quad (2)$$

$[c_0]$  ist die absolute Arzneistoffkonzentration bei einer CD-Konzentration von  $[c_c]$ .  $K_{1:1}$  und  $K_{1:2}$  sind die Komplexbildungskonstanten für einen 1:1- bzw. 1:2-Komplex. Eine Graphik von  $([c_0] - [c_s])/[c_c]$  gegen  $[c_c]$  führt zu einem linearen Zusammenhang, aus dem  $K_{1:1}$  und  $K_{1:2}$  berechnet werden können.

Neben der Komplexbestimmung im flüssigen Zustand sollten mögliche Arzneistoff/CD-Komplexe mittels FT-IR bzw. X-RD im festen Zustand charakterisiert werden (Material und Methoden, VI.2.3.2.1/ VI.2.3.2.2).

### **IV.3. In-vitro-Permeationsstudien durch isolierte Schweinecornea**

Mit den unter Theoretische Grundlagen, III.3.2 und III.3.4/ III.3.5 aufgeführten Betarezeptorenblockern und SEGRA wurden Permeationsstudien durch isolierte Schweinecornea durchgeführt. Die folgenden Ausführungen sollen einen Überblick über den Hintergrund dieser *In-vitro*-Versuche geben.

#### *IV.3.1. Theoretische Grundlagen*

##### **IV.3.1.1. In-vitro Modelle**

Nach dem Europäischen Arzneibuch gibt es verschiedene *In-vitro-Modelle* zur Simulation vorwiegend diffusionsbedingter Arzneistofffreisetzung aus festen, halbfesten und flüssigen Zubereitungen [54]. Es wird zwischen „Dissolution-Modellen“ und Freisetzungsmodellen mit Membranen unterschieden. Die „Dissolution-Modelle“ sind in erster Linie zur Prüfung der Arzneistoffliberation aus festen peroralen Arzneiformen relevant [54]. Membranmodelle werden angewendet, um den Einfluss einer Diffusionsbarriere (z.B. Cornea, Haut oder synthetische Barrieren) auf den Freisetzungsprozess zu berücksichtigen und/oder um den Einfluss verschiedener Formulierungsparameter (z.B. Hilfsstoffe, pH-Wert, Elektrolyte) auf den Liberations- und Permeationsvorgang unter konstanten Versuchsbedingungen zu evaluieren. Es werden sowohl künstliche als auch biologische Membranen, die – horizontal bzw. vertikal angeordnet – die Diffusionskammer in ein Donator- und ein Akzeptorkompartiment trennen, verwendet.

Zur Erklärung ophthalmologischer Fragestellungen werden Membranmodelle unter Nutzung der Cornea vom Kaninchen [46, 83, 143, 183, 200], Schwein [20, 29] und Rind [208] beschrieben. Abgesehen von der Größe, bestehen bezüglich der morphologischen Struktur zwischen Kaninchen-, Schwein- und Menschencornea lediglich geringe Unterschiede [52]. Bezüglich der Enzyme in der Cornea, insbesondere das Epithel betreffend, existieren jedoch einige Unterschiede zwischen den einzelnen Säugetierspezies [67, 175, 194].

##### **IV.3.1.2. Flux**

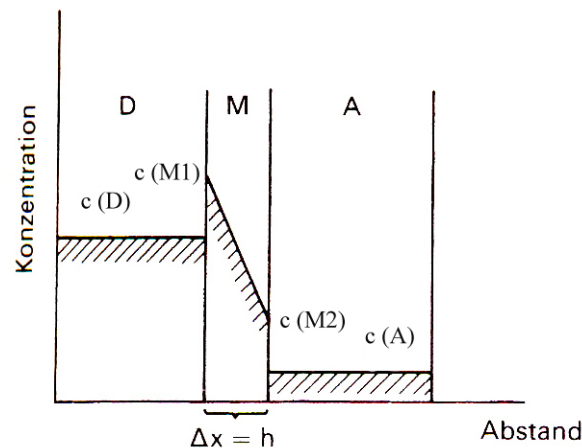
Unter den gewählten Versuchsbedingungen, bei denen der Konzentrationsunterschied zwischen Akzeptor- und Donatormedium annähernd konstant bleibt, stellt sich ein „steady-state“ bezüglich des Durchtritts der zu untersuchenden Substanz durch die Membran ein.

Die *Masse*  $Q$ , die durch eine *Flächeneinheit*  $A$  pro *Zeiteinheit* ( $t$ ) hindurchwandert, wird als *Flux* bzw. *Diffusionsstrom* bzw. *Massenstrom*  $J$  bezeichnet.

$$J = \frac{dQ}{A \cdot dt} = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (3)$$

Der *Massenstrom*  $J$  ist dem Konzentrationsgradienten  $dc/dx$  proportional. Gleichung 3 entspricht dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz, in dem die Proportionalitätskonstante  $D$  dem Diffusionskoeffizienten entspricht [136].

#### IV.3.1.3. Permeabilitätskoeffizient



**Abb. 14: Konstanter Konzentrationsgradient eines durch die Membranbarriere M diffundierenden Stoffes;** (D = Donatorphase, A = Akzeptorphase;  $c(D/A)$ : Konzentration in D/A); nach [136]

Abb. 14 stellt einen mehrstufigen Transportprozess über „drei Phasen“ dar. Zunächst ist der Stoff vollständig in der *Donatorphase*  $D$  gelöst, und in der *Akzeptorphase*  $A$  befindet sich reines Lösungsmittel. Während des Versuchs diffundiert der Stoff über das mittlere Kompartiment, z.B. eine *Barriere*  $M$ , vom Donator in den Akzeptor. Gleichzeitig wird die arzneistoffbeladene Akzeptorlösung kontinuierlich gegen reines Lösungsmittel partiell oder total ausgetauscht, so dass die Konzentration im Akzeptor auf einem sehr niedrigen Niveau gehalten wird [136], d.h. *Sink-Bedingungen* (Freisetzungskinetik 0. Ordnung) bestehen ( $c(A) \approx 0$ ). Im Akzeptorkompartiment dürfen während der gesamten Versuchsdauer 10% der Sättigungskonzentration des Arzneistoffs nicht überschritten werden.

Vorausgesetzt, der Gradient  $(c(M1)-c(M2))/h$  (Abb. 14) ist annähernd konstant (quasi-stationärer Zustand), die ruhenden Schichten an den Grenzschichten haben keinen

wesentlichen Einfluss auf die Stoffpermeation durch die Barriere, und die Übergangswiderstände sind klein, kann – Sink-Bedingungen im Akzeptorkompartiment angenommen – der *Permeabilitätskoeffizient*  $P$ , ausgehend von Gleichung (3), hergeleitet werden. Letzterer besitzt die gleiche Dimension wie eine lineare Geschwindigkeit [cm/s].

$$P_{eff} = \frac{dQ}{dt \cdot A \cdot c_0 \cdot 60} \quad (4)$$

$dQ/dt$  ist die Änderung der Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$  bzw.  $\text{mg/ml}$ ] im Akzeptorkompartiment pro Zeiteinheit  $t$  [min] und entspricht dem Anstieg der Geraden bei kumulativer Auftragung der permeierten Arzneistoffmenge [ $\mu\text{g}$  bzw.  $\text{mg}$ ] gegen die Zeit. 60 ist der Umrechnungsfaktor von Minuten in Sekunden.  $A$  bezeichnet die Permeationsfläche ( $\text{cm}^2$ ) und  $c_0$  die anfängliche Wirkstoffkonzentration.

Der *apparente Permeabilitätskoeffizient* ( $P_{app}$ ) entspricht dem *effektiven Permeabilitätskoeffizienten* ( $P_{eff}$ ), welcher sich im Fall der in dieser Arbeit verwendeten Membran (Schweinecornea) aus den Permeabilitäten des transzellulären und des parazellulären Weges sowie der stehenden Wasserschicht vor der Membran zusammensetzt.

Bei Auftreten einer „lag time“ ( $t_{lag}$ ), d.h. eines anfänglich nahezu parallelen Kurvenverlaufs im Freisetzung-Zeit-Diagramm, bevor der lineare Anstieg beginnt, wurden die  $P_{eff}$  nur für den linear ansteigenden Abschnitts bestimmt. Die  $t_{lag}$  wurde durch Extrapolation des linearen Abschnitts auf die Abszisse bestimmt [29].

Als weiterer Permeationsparameter wurde die kumulativ freigesetzte, prozentuale Arzneistoffkonzentration nach 300 min (Versuchsende) berechnet ( $Q_{300}$ ).

#### IV.3.2. Versuchsdurchführung

Eine von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Permeationsapparatur für Schweinecornea, die ein modifiziertes Ussing-Kammer-System [208] darstellt (vgl. Material und Methoden, VI.2.4.2), wurde zur Bestimmung des *In-vitro*-Permeationsverhaltens unterschiedlicher Betablocker- und SEGRA-Formulierungen verwendet.

Corneae frisch geschlachteter Schweine wurden mittels Skalpell und/oder einer chirurgischen Schere so herauspräpariert (Material und Methoden, VI.2.4.1), dass diese noch von einem schmalen Scleralring umgeben waren. Die Cornea wurde zwischen den beiden Hälften des

Permeationsmodells (Material und Methoden, VI.2.4.3) fixiert, die corneale Permeationsfläche betrug  $0,5\text{ cm}^2$ . Für die Studien mit Betablockern und Pilocarpin enthielt das Donator-kompartiment (Epithelseite) i.d.R. eine Lösung von Arzneistoff, CD bzw. Arzneistoff/CD, wobei in Glutathion-Bicarbonat-Ringerlösung (GBR) oder Sørensen-Phosphat-Pufferlösung (SPP) zumeist im neutralen pH-Bereich gearbeitet wurde. Das Akzeptorkompartiment enthielt 20 ml GBR bzw. SPP; die Akzeptorflüssigkeit wurde kontinuierlich umgepumpt. Alle 30 min, bis zu einem Zeitpunkt von 300 min, wurden Proben zu 1 ml aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und das fehlende Volumen mit 1 ml unbeladenem Puffer ergänzt, um ein konstantes Volumen von 20 ml Akzeptorflüssigkeit aufrechtzuerhalten.

Um CD-Effekte auf die corneale Integrität zu erfassen, wurden Corneae 30 min in CD-Lösung (1,85/ 3,7/ 10%  $\alpha$ -CD; 4,7/ 11,7% HP- $\alpha$ -CD, 12,5% HP- $\beta$ -CD) getaucht, bevor Permeationsstudien mit reiner Arzneistofflösung durchgeführt wurden (Vorbehandlung der Membran, s. Material und Methoden, VI.2.4).

Die Permeationsversuche durch synthetische Membran (Nephrophan<sup>®</sup>, regenerierte Cellulose) erfolgten in analoger Weise. Vor Anwendung wurde die Nephrophan<sup>®</sup>-Membran mindestens eine Stunde in Wasser eingelegt und auf eine Größe von ca.  $0,55\text{ cm}^2$  zugeschnitten.

#### **IV.4. In-vivo-Versuche (Kaninchen)**

Um die okulare Verteilung des Prodrugs MMF bzw. seiner aktiven Wirksubstanz MPA zu bestimmen, wurden *In-vivo*-Versuche am Kaninchen (Material und Methoden, VI.2.6.2) durchgeführt. Im Vordergrund stand der Vergleich einer MMF/CD-Lösung mit einer MMF-Suspension. Zusätzlich wurde die okulare Verteilung einer MPA/CD-Lösung vergleichend evaluiert.

Nach Applikation der jeweiligen Augentropfen wurden die Kaninchen (vier Tiere pro Versuchsgruppe) nach 30, 60 und 240 min getötet. Unmittelbar danach erfolgte die Entnahme von Plasma- und Kammerwasserproben sowie das Herauspräparieren von Glaskörper, Conjunctiva, Cornea und Sclera. Nach entsprechender Aufarbeitung (Material und Methoden, VI.2.6.3) wurde der Gehalt an MMF bzw. MPA in den Flüssigkeiten sowie in den jeweiligen okularen Geweben bestimmt.



#### **IV.5. In-vivo-Versuche (Ratte)**

Weiterhin kam der Selektive Glucocorticoidrezeptoragonist (SEGRA) ZK 247756 in Form einer CD-haltigen Mikroemulsion (ME-CD-SEGRA) bei hornhauttransplantierten Lewis-Ratten zur okularen Anwendung.

Es wurde die Transplantatabstoßung bei lokaler Behandlung mit ME-CD-SEGRA am x. postoperativen Tag im Vergleich zu 2 nichtbehandelten Kontrollgruppen (Gruppe 1: syngene Transplantate, Gruppe 2: allogene Transplantate) sowie einer Gruppe von Lewis-Ratten, denen nur wirkstofffreies Vehikel (ME-CD) appliziert wurde, getestet. Die topische Behandlung mit den jeweiligen Augentropfen erfolgte am Tag der Transplantation mit einer „loading-dose“ von 5 x 20 µl, an den darauffolgenden Tagen wurden 5 x täglich 20 µl appliziert (Material und Methoden, VI.2.7.3.4). Die Transplantate wurden nach etablierten Beurteilungskriterien [160, 164] begutachtet. Ferner erfolgte die Bestimmung der immunologischen Parameter mittels PCR (Material und Methoden, VI.2.7.3.5/ VI.2.7.3.6).

## V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### V.1. Betarezeptorenblocker

Ziel der nachfolgenden Studie war es, das Permeationsverhalten der drei jeweils strukturell ähnlichen Betarezeptorenblocker-Paare (Pindolol/Mepindolol, Metoprolol/Betaxolol, Alprenolol/Oxprenolol) durch isolierte Schweinecornea vergleichend zu untersuchen.

Diese  $\beta$ -Rezeptorenblocker sind  $\beta$ -Sympatholytika, die sich chemisch vom Aryloxypropanolamin ableiten. Sie unterscheiden sich durch ihren Substituenten (Theoretische Grundlagen, III.3.2.1) am C 1 des Isopropylamino-2-propanols, d.h. an der 1-Hydroxylfunktion, die mit einem carbo- oder heterocyclischen Aromaten verethert ist.

Dabei liegen im Pindolol und Mepindolol Substanzpaare mit einem Indolylsubstituenten vor. Metoprolol und Betaxolol leiten sich vom  $\beta$ -Methoxyethylphenylether des pharmakologischen Grundkörpers (Theoretische Grundlagen, III.3.2.1) ab. Alprenolol trägt einen o-Allyl-phenylrest, während Oxprenolol eine o-Allylethergruppierung am Phenylsubstituenten besitzt.

Darüber hinaus sollte der Einfluss verschiedener CDe ( $\alpha$ -CD, HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD) auf die *In-vitro*-Permeation eines ausgewählten Betablockers (Mepindololsulfat (MEP)) getestet werden.

Am Pindolol (PIN), das als einziger Ausgangsstoff als schwerlösliche Base vorlag (Untersuchungen, IV.1., Tabelle 11), wurde die Komplexbildungstendenz mit den nativen CDen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -CD), deren hydroxypropylierten Derivaten bzw. mit  $\alpha$ -CD-Polymer ( $\alpha$ -CD-Pol) sowie mit carboxymethyliertem  $\alpha$ -CD-Polymer (CM- $\alpha$ -CD-Pol) in wässriger Lösung studiert. Der nachfolgenden Untersuchung des Permeationsverhaltens ausgewählter wässriger PIN/CD-Lösungen lag die Idee zugrunde, die hydrophobe PIN-Base, welche biologische Membranen erwartungsgemäß besser durchdringt als ein entsprechendes hydrophiles Salz (vgl. Pilocarpin-HCl und Pilocarpin-Base [143, 202]), durch einen CD-Einschluss bei neutralem pH-Wert in wässriger Lösung zu halten. Verglichen wurden diese Komplexlösungen mit dem Handelspräparat Pindoptyan<sup>®</sup> 0,5%, das 0,5% PIN enthält.

### V.1.1. In-vitro-Permeation aus Pufferlösungen

Die wasserlöslichen Salze der Betablocker (vgl. Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 4) wurden in 0,5%iger Konzentration (berechnet als Base) in GBR pH 7,4 gelöst und hinsichtlich ihres Permeationsverhaltens durch isolierte Schweinecornea über fünf Stunden verglichen (Material und Methoden, VI.2.4). PIN konnte aufgrund seiner Schwerlöslichkeit nicht einbezogen werden.

Tabelle 12 gibt die Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{\text{eff}}$ ) für die als Salz vorliegenden wasserlöslichen Betablocker sowie die nach 300 min prozentual freigesetzte Arzneistoffmenge  $Q_{300}$  wieder.

**Tabelle 12: Effektive Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{\text{eff}}$ ) und nach 300 min kumulativ freigesetzte Arzneistoffmenge ( $Q_{300}$ ) für Betablocker (Schweinecornea<sup>E</sup>)**

Arzneistoff	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}$ cm/s]	$Q_{300}$ [%]
Betaxolol-HCl	$2,84 \pm 0,63$ %	$2,74 \pm 0,86$
Metoprololtartrat	$2,77 \pm 0,31$ %	$2,25 \pm 0,41$
Mepindololsulfat	$2,52 \pm 0,54$ %	$2,09 \pm 0,50$
Alprenolol-HCl	$0,87^* \pm 0,27$ $t_{\text{lag}} = 120 \text{ min}$	$0,77^* \pm 0,33$
Oxprenolol-HCl	$0,27^* \pm 0,04$ $t_{\text{lag}} = 120 \text{ min}$	$0,42^* \pm 0,11$

$t_{\text{lag}}$ : lag time (%: keine  $t_{\text{lag}}$ ); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-10); (\*) signifikanter Unterschied (Single-Factor-ANOVA) zu Betaxolol-HCl, Metoprololtartrat, Mepindololsulfat für  $p < 0,05$

Betaxolol, Metoprolol und Mepindolol unterscheiden sich weder im  $P_{\text{eff}}$  noch in ihrer am Versuchsende kumulativ freigesetzten Gesamtkonzentration  $Q_{300}$  signifikant ( $p < 0,05$ ).

Bei pH 7,4 liegen die Substanzen fast vollständig als freie Base vor. Die unterschiedlichen Anionen (Chlorid, Tartrat bzw. Sulfat) nehmen offensichtlich keinen nennenswerten Einfluss auf die Wirkstoffpermeation. Da von molekularen Konzentrationen, bezogen auf die jeweilige Base, ausgegangen wurde und sich die Molmassen der Wirkstoffbasen lediglich geringfügig unterscheiden (vgl. Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 5), war auch kein wesentlich

abweichendes Diffusionsverhalten zu erwarten.

Ein weiterer Aspekt ist der Molekülradius, der für Betaxolol 5,0 und für Metoprolol 4,8 Å [168, 238] beträgt. Der Porenradius von Schweinecornea (Epithel) wird mit < 3 nm [70, 226] angegeben, so dass weder Molekülgröße noch -masse ein Limit für einen konvektiven Transport sein sollten.

Nimmt man allerdings die in der Literatur referierten Verteilungskoeffizienten ( $V_K$ ) dieser drei Verbindungen (vgl. Tabelle 5) ins Visier, so fällt der höhere Wert des Betaxolols bei pH 7,4 auf (3,9 gegenüber 1,58 für Metoprolol und 0,79 für Mepindolol). Dieser deutlich stärker apolare Charakter ließe einen Beitrag an passiver Diffusion erwarten, wofür die Werte in Tabelle 12 aber nicht sprechen.

Alprenolol und Oxprenolol permeierten in einem wesentlich geringeren Ausmaß durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup> als die drei zuvor genannten  $\beta$ -Blocker (Tabelle 12). Sowohl die  $P_{\text{eff}}$  als auch die nach 300 min prozentual freigesetzte Arzneistoffmenge unterscheiden sich signifikant zu Betaxolol, Metoprolol und Mepindolol. Die für Alprenolol und Oxprenolol ermittelten Werte differieren jedoch untereinander nicht signifikant. Auffallend ist die ermittelte „lag time“ beider Wirkstoffe von 120 min.

SCHOENWALD et al. [200] untersuchten das Permeationsverhalten verschiedener  $\beta$ -Blocker durch Kaninchencornea *in vitro* nach abnehmender Lipophilie ( $V_K$ : Penbutolol > Bufuralol > Bevantolol = Propranolol = Levobunolol, *Oxprenolol*, Timolol, *Metoprolol*, Acebutolol, Nadolol, Sotalol, Atenolol). Sie konnten zeigen, dass der  $P_{\text{eff}}$  der Wirkstoffe unterschiedlicher Lipophilie mit steigendem  $V_K$  (Octanol/Sørensen-Phosphatpuffer pH 7,65) in der Regel zunimmt.

Die Lipophilie von Alprenolol ist nach den in Tabelle 5 (Theoretische Grundlagen, III.3.2.1) aufgeführten Literaturdaten am höchsten ( $V_K$  bei pH 7,4: Alprenolol (21,88) > Oxprenolol (5,25) > Betaxolol (3,9) > Metoprolol (1,58) > Pindolol (1,20) > Mepindolol (0,79)).

An der chemischen Struktur der beiden strukturverwandten Verbindungen Alprenolol und Oxprenolol (Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 4) fällt auf, dass sich die Substituenten am Aromaten (Indolyl- bzw. Phenyl-) in ortho-Stellung befinden, wohingegen sie bei Metoprolol und Betaxolol eine para-Stellung aufweisen. Das am wenigsten permeable Oxprenolol verfügt im Vergleich zu Alprenolol darüber hinaus über eine Ethergruppierung

zwischen Phenyl- und Allylrest, was die Hydrophilie der Verbindung erhöht (vgl.  $V_K$ ). Andererseits könnten die freien Elektronenpaare am Sauerstoff aber auch für intra- und intermolekulare Wechselwirkungen prädestiniert sein, was möglicherweise zu großen und unflexiblen Molekülverbänden führen kann. Sofern auch für das o-substituierte Alprenolol derartige Assoziatbildungen denkbar wären, ließe sich die verminderte Freisetzungsrates für beide Moleküle erklären. Dieses Phänomen könnte einen Ansatz für weitere Untersuchungen darstellen.

Dissoziationsgrad und Molekülgröße kommen auch für die Alprenolol- und Oxprenolol-Permeation nicht als Determinanten in Betracht. Beide Wirkstoffe lagen beim Versuchs-pH von 7,4 fast vollständig als Base vor (vgl.  $pK_a$ , Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 5). Der für beide Moleküle gefundene Radius von 4,7 Å [168, 238] ist mit den für Betaxolol (5,0 Å) und Metoprolol (4,8 Å) zitierten Werten praktisch identisch.

PRAUSNITZ und NOONAN [168] führten eine Literaturanalyse bezüglich des okularen Permeationsverhaltens verschiedener Arzneistoffe durch isolierte Kaninchencornea durch. Die referierten  $P_{eff}$  für Betaxolol, Metoprolol, Alprenolol und Oxprenolol unterscheiden sich mit 2,7; 2,8; 2,9 bzw.  $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$  nur unwesentlich untereinander. Im Vergleich mit den ermittelten  $P_{eff}$  für Schweinecornea differieren die Ergebnisse allerdings um ca. eine Zehnerpotenz. Dies lässt vermuten, dass die von PRAUSNITZ und NOONAN zitierte Kaninchencornea für die zuvor genannten Betablocker leichter permeabel ist als Schweinecornea<sup>E</sup>.

Für die Permeationsstudien durch isolierte Schweinecornea wurde ebenfalls erwartet, dass die  $P_{eff}$  der getesteten Betablocker sich untereinander nicht wesentlich unterscheiden. Letzteres konnte in den durchgeführten Versuchen aber nicht bestätigt werden. Es bleibt offen, ob die Ursache hierfür in der Verwendung der unterschiedlichen Membranen zu suchen ist oder andere Ursachen verantwortlich waren.

Aufgrund der geringen Permeabilität von Alprenolol und Oxprenolol durch isolierte Schweinecornea wurden im Folgenden keine weiteren Versuche durchgeführt.

## V.1.2. *In-vitro-Permeation aus Cyclodextrin-Formulierungen*

### V.1.2.1. Versuchsdurchführung

Mepindololsulfat (MEP) wurde als Modellsubstanz für *In-vitro*-Permeationsstudien aus CD-haltigen Formulierungen ausgewählt. Wie auch in der Vorläuferarbeit von SIEFERT [207], in der die Permeation einer 2%igen Pilocarpinhydrochlorid (P)-Lösung in Gegenwart von CDen durch isolierte Rindercornea getestet wurde, lag MEP (Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 4) als gut wasserlöslicher Arzneistoff vor. P wurde in der vorhergehenden Arbeit [207] im Zusammenhang mit relativ hohen CD-Konzentrationen (13,92%  $\alpha$ -CD; 22,08% Hydroxyethyl- $\beta$ -cyclodextrin (HE- $\beta$ -CD); 22,96% HP- $\beta$ -CD) getestet. Diese Ergebnisse zeigten eine signifikante Zunahme des  $P_{\text{eff}}$  für  $\alpha$ -CD. Im Gegensatz dazu nahm der  $P_{\text{eff}}$  in Gegenwart von HE- $\beta$ -CD und HP- $\beta$ -CD signifikant ab.

In der vorliegenden Arbeit sollte an MEP der konzentrationsabhängige Einfluss von  $\alpha$ -CD auf die corneale Permeation, insbesondere in niedrigeren Konzentrationen, getestet werden. Analog dazu war der Einfluss des hydroxypropylierten  $\alpha$ -CD-Derivats (HP- $\alpha$ -CD) zu untersuchen, um gegebenenfalls Unterschiede zwischen dem nativen und substituierten CD aufzuzeigen. Darüber hinaus wurden die ebenfalls hydroxypropylierten Derivate des  $\beta$ -CDs (HP- $\beta$ -CD) und des  $\gamma$ -CDs (HP- $\gamma$ -CD), deren gute okulare Verträglichkeit bis zu einer Konzentration von 12,5% bekannt ist [87, 221], in die Untersuchungen einbezogen. Im Unterschied zur Vorläuferarbeit wurden diese *In-vitro*-Permeationsversuche an isolierter Schweinecornea an Stelle von Rindercornea durchgeführt (Material und Methoden, VI.2.4).

Weiterhin wurde das Permeationsverhalten des strukturverwandten, aber in der vorliegenden Basenform schwerlöslichen Pindolols (PIN, Theoretische Grundlagen, III.3.2.1, Tabelle 4), das mit Hilfe von CDen in Lösung gebracht werden konnte, untersucht.

Ein weiteres Anliegen war die Untersuchung einer Kombination eines ausgewählten  $\beta$ -Blockers mit dem ebenfalls glaukomwirksamen Sympathomimetikum P (Theoretische Grundlagen, III.2.3). Derartige Kombinationspräparate werden in der Literatur [22, 48, 247] als effektiv und nebenwirkungsarm beschrieben. Für die eigenen Versuche wurde das MEP ausgewählt, für das es bisher weder ophthalmologische Mono- noch Kombinationspräparate gibt.

Da Arzneistoff/CD-Komplexbildung Ursache für veränderte *In-vitro*-Verfügbarkeit sein kann, wurden darüber hinaus entsprechende Untersuchungen am MEP und PIN mit ausgewählten CDe nachgestellt (V.1.2.6).

#### V.1.2.2. Mepindolol / $\alpha$ -Cyclodextrine

Die Permeationsparameter für MEP-Formulierungen, die  $\alpha$ -CD bzw. HP- $\alpha$ -CD in abgestuften Konzentrationen enthielten, gibt Tabelle 13 wieder. Der Zusatz von  $\alpha$ -CD in den molaren Verhältnissen 1:1, 1:2 und 1:5 erhöhte den  $P_{\text{eff}}$  von MEP ( $2,52 \pm 0,54 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) um das 1,4/ 2,5/ 3,2fache, wobei sich die Werte erst ab 3,7%  $\alpha$ -CD (1:1) signifikant von der Referenz unterschieden.

**Tabelle 13: Permeabilitätsparameter von Mepindolol (MEP; 0,5% – bezogen auf die Base) sowie aus  $\alpha$ - und HP- $\alpha$ -CD-Lösungen (isolierte Schweinecornea<sup>E</sup>)**

0,5 % MEP		MEP : CD [mol : mol ]	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6} \text{ cm/s}$ ]	$Q_{300}$ [%]
sine CD (Referenz)			$2,52 \pm 0,54$	$2,09 \pm 0,50$
+ 1,85%	$\alpha$ -CD	1 : 1	$3,49 \pm 0,60$	$2,80 \pm 0,52$
+ 3,7%	$\alpha$ -CD	1 : 2	$6,32^* \pm 1,23$	$5,04^* \pm 0,90$
+ 10%	$\alpha$ -CD	1 : 5	$8,00^* \pm 0,47$	$6,29^* \pm 0,40$
+ 4,7%	HP- $\alpha$ -CD	1 : 2	$3,34 \pm 0,73$	$3,55 \pm 0,87$
+ 11,7%	HP- $\alpha$ -CD	1 : 5	$3,50 \pm 0,38$	$3,46 \pm 0,65$
+ 20%	HP- $\alpha$ -CD	1 : 8	$3,02 \pm 0,93$	$2,87 \pm 0,78$

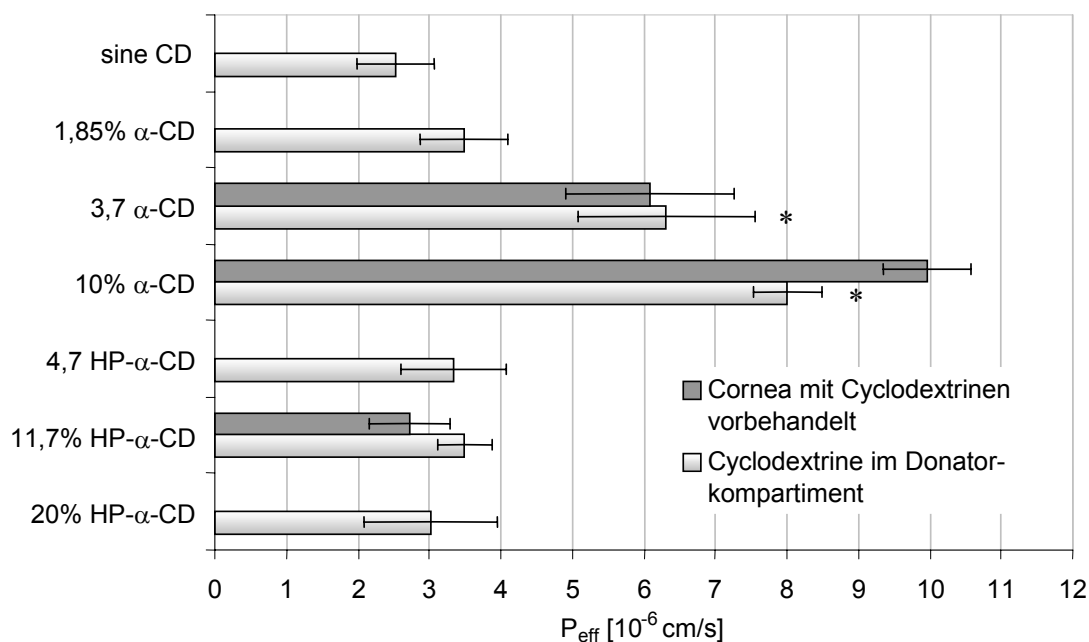
Mittelwert  $\pm$  SD (n = 6-10); \*signifikant zur Referenz für  $p < 0,05$  (t-Test)

Im Gegensatz dazu ergab die leichte Zunahme des  $P_{\text{eff}}$  in Anwesenheit von HP- $\alpha$ -CD im Donator keine Signifikanz zur Referenz und auch keine tendenzielle Konzentrationsabhängigkeit. Die Werte lagen zudem signifikant unter den  $P_{\text{eff}}$  für das native  $\alpha$ -CD bei gleichem Arzneistoff/CD-Verhältnis.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse müssen prinzipiell sowohl die potentielle Komplexierungstendenz der getesteten CDe als auch der direkte Einfluss dieser Hilfsstoffe auf die biologische Membran in Betracht gezogen werden. Da für eine Komplexierung von MEP in den  $\alpha$ -CD-haltigen Lösungen keine eindeutigen Hinweise vorlagen (V.1.2.6.2),

wurde vordergründig dem Aspekt der Membranschädigung nachgegangen. Hierzu erfolgte eine jeweils halbstündige Vorbehandlung der Cornea (Material und Methoden, VI.2.4.3) mit den Test-CDen.

Die Vorbehandlung der Cornea mit HP- $\alpha$ -CD (11,7%) änderte die Membranpermeabilität nicht (Abb. 15). Weder der  $P_{\text{eff}}$  noch der  $Q_{300}$ -Wert (Tabelle 14) wichen signifikant von der Referenz ab. Im Gegensatz dazu resultierte bei Vorinkubation der Cornea mit 3,7 bzw. 10%  $\alpha$ -CD eine signifikante Erhöhung des  $P_{\text{eff}}$  von MEP gegenüber der Referenz in der gleichen Größenordnung wie sie bei primärem Vorliegen von  $\alpha$ -CD im Donatorkompartiment ermittelt wurde. Dieses Resultat legt die Vermutung nahe, dass die durch  $\alpha$ -CD hervorgerufenen Permeabilitätssteigerungen vorwiegend durch Veränderungen am cornealen Gewebe verursacht worden waren.



**Abb. 15: Permeabilitätskoeffizienten von Mepindolol (0,5%) durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup>; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 6-10); \*signifikant zur Referenz (sine CD) für  $p < 0,05$**

Effekte, die die Integrität der biologischen Membran betreffen, sind für  $\alpha$ -CD aus der Literatur bekannt [96, 106, 149, 227]. Auch für weitere CDe (Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M- $\beta$ -CD), Dimethyl- $\beta$ -Cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) [87] wird beschrieben, dass sie in der Lage sind, Bestandteile der Zellmembranen (z.B. Cholesterol, Phospholipide und Proteine) zu inkludieren und damit „herauszulösen“. Nicht geklärt ist bisher, ob diese membranbedingten



Enhancereffekte einiger CDe als reversibel oder irreversibel zu betrachten und bis zu welchem Ausmaß sie zu tolerieren sind. Weiterhin bleibt offen, ob sich diese Schädigung lediglich auf das Epithel, das im Allgemeinen gut regenerierfähig ist [38], beschränkt oder auch eine mögliche irreversible Schädigung von Stroma und Endothel erfolgt.

**Tabelle 14: Permeationsparameter von Mepindolol (MEP; 0,5% – bezogen auf die Base) ohne/nach Vorbehandlung der Schweinecornea<sup>E</sup> mit Cyclodextrin (CD)-Lösungen**

Cornea vorbehandelt mit:	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}\text{cm/s}$ ]	$Q_{300}$ [%]
ohne Vorbehandlung	$2,52 \pm 0,54$	$2,09 \pm 0,50$
3,7% $\alpha$ -CD	$6,09^* \pm 1,18$	$5,31^* \pm 1,00$
10% $\alpha$ -CD	$9,96^* \pm 0,60$	$9,03^* \pm 2,08$
11,7% HP- $\alpha$ -CD	$2,73 \pm 0,56$	$2,88 \pm 0,55$

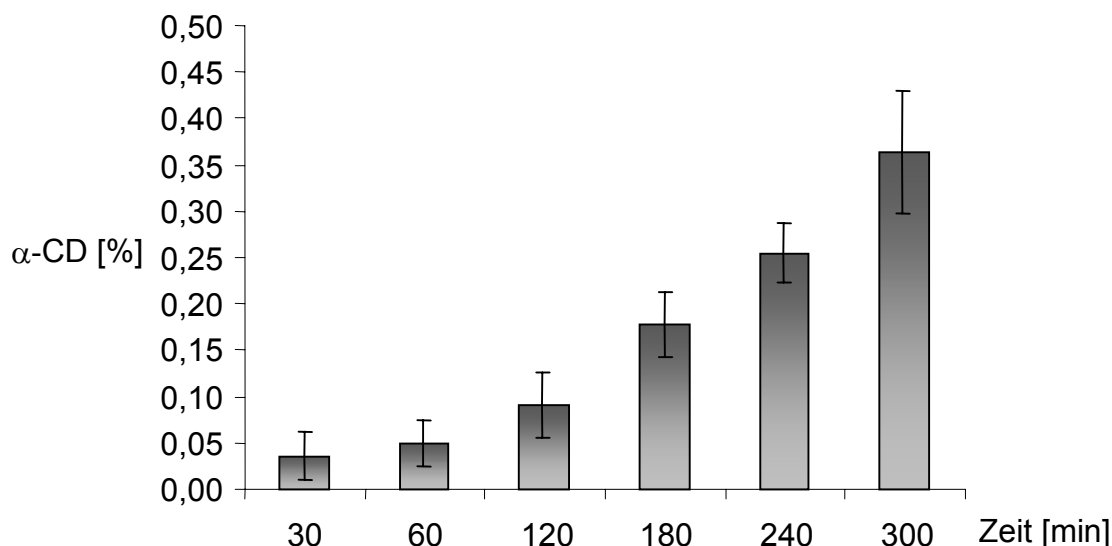
Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-6); \*signifikant zur Referenz (ohne Vorbehandlung) für  $p < 0,05$

Es ist anzunehmen, dass eine okulare Anwendung von  $\alpha$ -CD *in vivo* aufgrund der sehr kurzen Kontaktzeit von Augentropfen zu wesentlich weniger dramatischen Membraneffekten führen würde als im *In-vitro*-Versuch, bei dem  $\alpha$ -CD langfristig intensiv auf das Epithel einwirken kann. Weitere Untersuchungen sind hierfür erforderlich. Da  $\alpha$ -CD, das kleinste Molekül unter den nativen CDen, befähigt ist, biologische Membranen wie die Cornea partiell zu passieren [207], könnte es auch eine Carrierfunktion ausüben und den Arzneistoff, sofern komplexierbar (Komplexe konnten nicht sicher nachgewiesen werden, s. V.1.2.6.2), in Form eines CD-Komplexes durch die Membran schleusen.

Die Membranpermeation von  $\alpha$ -CD selbst ist offensichtlich konzentrationsabhängig. Während SIEFERT et al. [207] eine Permeationsrate aus 13,92%iger Lösung von ~17% nach 5 h fanden, resultierte aus den eigenen Versuchen mit 3,7%  $\alpha$ -CD lediglich ein kumulativer Endwert von 0,36% (Abb. 16). Auffällig ist allerdings die Zunahme des permeierten Anteils mit der Zeit in beiden Versuchsreihen. Zur Erklärung der  $\alpha$ -CD-Permeation gibt es weitere Postulate:

Da der Durchmesser des  $\alpha$ -CDs lediglich 4,7-5,3 Å (0,47-0,53 nm) beträgt, könnten die wassergefüllten interzellulären Zwischenräume im Corneaepithel (Durchmesser < 3 nm) sowie epitheliale Poren mit Durchmessern von 1-3 nm [70] mögliche Passagewege durch die

Cornea darstellen. Weiterhin wurde eine mögliche Inklusion membranständiger  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen durch das CD-Molekül und eine daraus resultierende Weitung der Tight-junctions diskutiert [207].



**Abb. 16: Permeation von  $\alpha$ -CD durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>**  
(Ausgangslösung: 3,7%  $\alpha$ -CD); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5)

Mit der Anwendung von  $\alpha$ -CD in Augentropfen-Vehikeln beschäftigten sich auch andere Forschungsgruppen [5, 97, 193, 222]. Beispielsweise wurde  $\alpha$ -CD im Zusammenhang mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin zur okularen Anwendung getestet [193]. Die corneale Toxizität des  $\alpha$ -CD in dieser Formulierung wurde von KANAI et al. [96] untersucht. SASAMOTO et al. [193] zeigten, dass eine topische Cyclosporin-Anwendung (0,075%) in  $\alpha$ -CD als Vehikel bei endotoxininduzierter Uveitis am Kaninchenauge, insbesondere im vorderen Augenabschnitt, effektiv ist. TAKANO et al. [222] stellten fest, dass 0,025%ige Cyclosporin-Augentropfen (mit 4%  $\alpha$ -CD) die Cornea (Kaninchen) 5 bis 10mal stärker penetrierten als eine analoge Konzentration an Cyclosporin in verschiedenen lipophilen Vehikeln. Diese Studie sowie die von AKIYAMA et al. [5] durchgeführten Untersuchungen belegen die sinnvolle Anwendung von Cyclosporin/ $\alpha$ -CD-Formulierungen nach Keratoplastik am Kaninchen. In neueren *In-vivo*-Studien wurden ferner die okulare Penetration von Delta9-tetrahydrocannabinol in einer  $\alpha$ -CD-Formulierung am Kaninchen untersucht [71].

#### V.1.2.3. Mepindolol / HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD

Da HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD bisher häufig ophthalmologisch eingesetzt bzw. getestet wurden und im Allgemeinen am Auge sehr gut verträglich sind (s.v.), gelangten sie auch mit MEP (0,5% – bezogen auf die Base) für Permeationsstudien zur Testung. In Analogie zu Literaturangaben wurde eine CD-Konzentration von 12,5% gewählt. Zu Vergleichszwecken wurde auch eine 12,5% HP- $\alpha$ -CD enthaltende Formulierung in diese Versuchsserie einbezogen. Der resultierende  $P_{\text{eff}}$  (Tabelle 15) entspricht den bereits in Tabelle 13 für HP- $\alpha$ -CD dokumentierten Werten (für 4,7/ 11,7/ 20% HP- $\alpha$ -CD) und unterscheidet sich nicht signifikant von der Referenz. Es ergaben sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von den getesteten Konzentrationen (Tabellen 13 und 15).

Im Gegensatz dazu verringerte HP- $\gamma$ -CD den  $P_{\text{eff}}$  signifikant etwa auf die Hälfte des Wertes der CDfreien Referenz (Tabelle 15). Mögliche Komplexierung von MEP mit HP- $\gamma$ -CD könnte die Ursache der verminderten Permeation des Arzneistoffs sein. Allerdings liegt der kumulative Endwert  $Q_{300}$  von Referenz und HP- $\gamma$ -CD-haltigem Versuch in der gleichen Größenordnung.

Die Ergebnisse der MEP-Permeation in Gegenwart von 12,5% HP- $\beta$ -CD (Tabelle 15) zeigten nicht die ebenfalls erwartete Abnahme des errechneten  $P_{\text{eff}}$ , sondern führten zu einer signifikanten (1,73fachen) Zunahme dieses Wertes und auch zur vergleichweisen Erhöhung von  $Q_{300}$ .

An dieser Stelle muss eingefügt werden, dass die Bezugsquelle für Schweineaugen aufgrund der Schließung des Schlachthofs Eberswalde-Britz (Material und Methoden, VI.2.4.1) gewechselt werden musste. Da hierbei differierende Ergebnisse resultierten, wurden in diesem Teil der Arbeit die MEP-Versuche mit den hydroxypropylierten CDen und zur Kontrolle auch mit  $\alpha$ -CD sowohl mit Corneae vom Schlachthof Eberswalde (gekennzeichnet als Schweinecornea<sup>E</sup>) als auch vom Versuchsschlachtbetrieb Teltow (Schweinecornea<sup>T</sup>) durchgeführt, deren Ergebnisse in den Tabellen 15 und 16 dokumentiert sind. Es fällt auf, dass die  $P_{\text{eff}}$  durch Schweinecornea<sup>T</sup>, die eine schonendere Vorbehandlung erfuhr (s. Material und Methoden, VI.2.4.1), für die Referenz (Tabelle 16) etwa den doppelten Wert gegenüber Tabelle 15 (Schweinecornea<sup>E</sup>) aufweist (signifikanter Unterschied!) und auch die MEP-Permeation mit CDen bei Schweinecornea<sup>T</sup> für HP- $\gamma$ -CD und  $\alpha$ -CD zu höheren Werten

tendiert. Nicht eindeutig ist auch das Resultat für HP- $\beta$ -CD. Während entsprechend Tabelle 15 der  $P_{\text{eff}}$  um den Faktor 1,73 gegenüber der Referenz erhöht ist, resultiert nach Tabelle 16 eine um den Faktor 0,54 erniedrigte MEP-Permeation. Diese Abnahme des  $P_{\text{eff}}$  ist jedoch nicht signifikant. Der statistisch ermittelte Fehler ist hoch und beträgt 52,6%. Weiterhin ist anzumerken, dass die MEP-Permeation durch Schweinecornea<sup>E</sup> aus 12,5%iger HP- $\beta$ -CD-Lösung eine „lag time“ von 90 min aufweist (Tabelle 15). Dafür ließ sich bisher keine Erklärung finden.

**Tabelle 15: Permeationsparameter von Mepindolol (MEP) durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup> sowie in Gegenwart von 12,5% hydroxypropyliertem  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrin (CD) und 3,7%  $\alpha$ -CD**

0,5 % MEP	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}\text{cm/s}$ ]	$Q_{300}$ [%]	Faktor [ $P_{\text{eff CD}}/P_{\text{eff sine}}$ ]
Referenz (sine CD)	$2,52 \pm 0,54$	$2,09 \pm 0,50$	-
+ 12,5% HP- $\alpha$ -CD	$3,31 \pm 0,57$	$2,70 \pm 0,41$	1,31
+ 12,5% HP- $\beta$ -CD	$^14,37^* \pm 0,55$	$3,19^* \pm 0,68$	1,73
+ 12,5% HP- $\gamma$ -CD	$1,50^* \pm 0,18$	$2,01 \pm 0,41$	0,60
+ 3,7% $\alpha$ -CD	$6,32^* \pm 1,23$	$5,04^* \pm 0,90$	2,51

Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-10); \*signifikant zur Referenz (sine CD) für  $p < 0,05$ ; 1lag time: 90 min  
(Für die anderen  $P_{\text{eff}}$  existiert keine lag time.)

Im Resümee verdeutlichen diese Unterschiede, dass die Verwendung von Schweinecornea unterschiedlicher Herkunft bzw. von Schweinecornea von Schweinen, mit denen nach der Schlachtung unterschiedlich verfahren wurde („Überbrühen“, Material und Methoden, VI.2.4), zu veränderter Permeabilität führen kann.

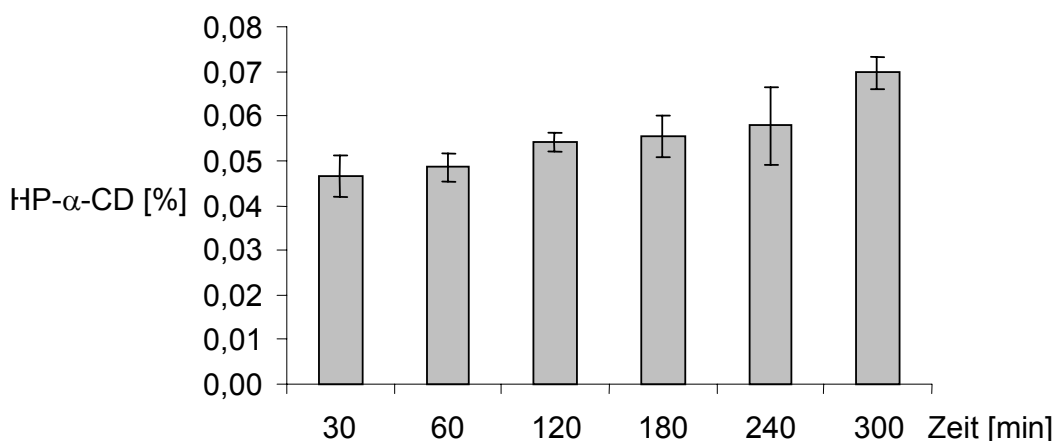
Eine Standardisierung der Testmembranen scheint kaum realisierbar. Innerhalb des gleichen Ausgangsmaterials können jedoch Effekte, die durch Hilfsstoffe wie CDe hervorgerufen werden, im Vergleich zur Referenz diskutiert werden. Dagegen scheint ein Vergleich von Absolutwerten (z.B. Flux und  $P_{\text{eff}}$ ), resultierend aus unterschiedlichem biologischen Ausgangsmaterial unzulässig. Dieses Erkenntnis macht deutlich, wie problematisch der Vergleich eigener Daten mit Literaturangaben ist.

**Tabelle 16: Permeationsparameter von Mepindololsulfat (MEP) durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> sowie in Gegenwart von HP- $\beta$ -CD und  $\alpha$ -CD**

0,5 % MEP	$P_{\text{eff}}$ [10 <sup>-6</sup> cm/s]	$Q_{300}$ [%]	Faktor [ $P_{\text{effCD}}/P_{\text{effsine}}$ ]
Referenz (sine CD)	5,99 ± 0,29	4,89 ± 0,17	-
+ 12,5% HP- $\beta$ -CD	3,29 ± 1,73	2,72 ± 1,43	0,54
+ 12,5% HP- $\gamma$ -CD	3,04* ± 0,90	2,53* ± 0,71	0,51
+ 3,7% $\alpha$ -CD	13,04* ± 0,35	10,11* ± 1,13	2,18

Mittelwert ± SD (n = 5-8); \*signifikant zur Referenz (sine CD) für p < 0,05;  
(Für alle  $P_{\text{eff}}$  existiert keine lag time.)

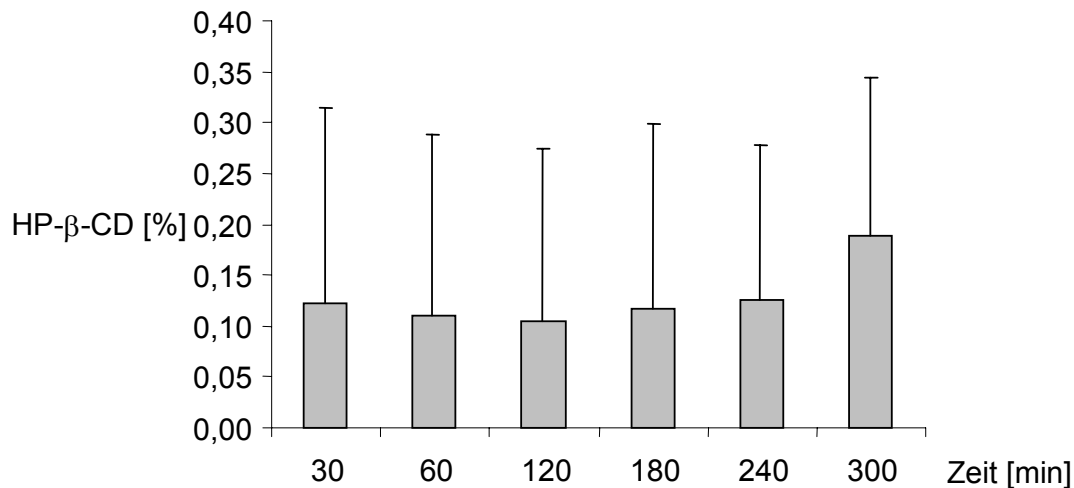
Zur Absicherung der Ergebnisse und zur ggf. eindeutigeren Interpretation der Permeationsdaten, erfolgte mit den hier verwendeten CD-Derivaten in 12,5%iger Konzentration eine Überprüfung ihrer Eigenpermeation. Nach Vorversuchen im Arbeitskreis [207] und Literaturhinweisen [122, 123] dürften diese „sperrigen“ Hydroxypropyl-CDe jedoch kaum permeabel sein. Die an Schweinecornea<sup>T</sup> gewonnenen Ergebnisse sind in Abb. 17 - Abb. 19 dargestellt.



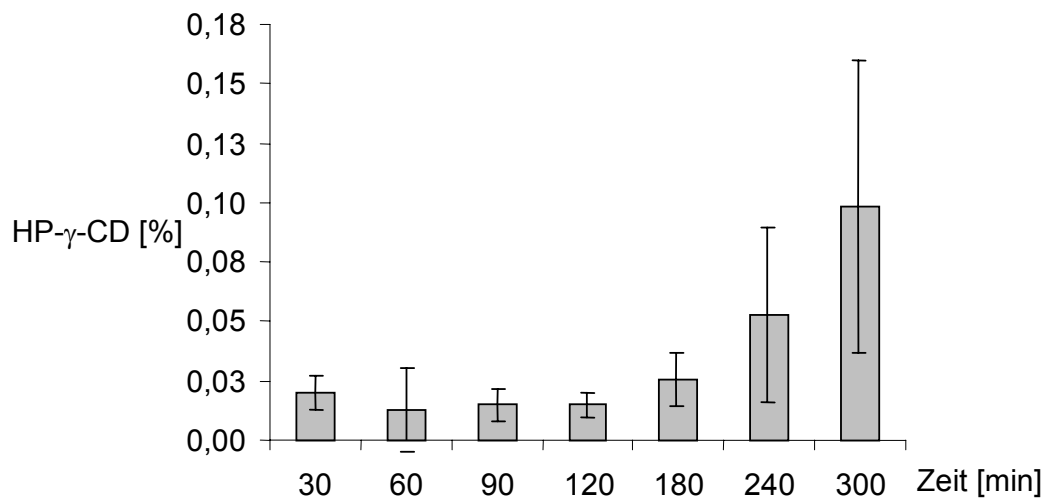
**Abb. 17: Permeation von HP- $\alpha$ -CD durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> (Donatorlösung: 12,5% HP- $\alpha$ -CD); Mittelwert ± SD (n = 5)**

Demnach war die Eigenpermeation von HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD sehr niedrig (durchschnittlich 0,07-0,19%) und mehr oder weniger über den Versuchszeitraum konstant. Allerdings sind die relativen Standardabweichungen, insbesondere für HP- $\gamma$ -CD (35,4-

141,4%) und HP- $\beta$ -CD (81,3-160,9%), sehr hoch, was dafür spricht, dass sich die CDe über den Testzeitraum nicht absolut indifferent gegenüber der Membran verhalten.



**Abb. 18: Permeation von HP- $\beta$ -CD durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>**  
(Donatorlösung: 12,5% HP- $\beta$ -CD); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5)



**Abb. 19: Permeation von HP- $\gamma$ -CD durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>**  
(Donatorlösung: 12,5% HP- $\gamma$ -CD); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5)

Auch die von SIEFERT et al. [207] durchgeführten Versuche mit 12,5% HP- $\gamma$ -CD an Rindercornea zeigten große Schwankungen und eine Permeationsrate von 1,1% nach fünf Stunden. Prinzipiell bestätigen die Permeationsversuche mit den hydroxypropylierten CDen Hypothesen bzw. Untersuchungen aus der Literatur, die annehmen, dass diese CD-Derivate nur mit äusserster Schwierigkeit die Cornea passieren können [122, 127, 137].

#### V.1.2.4. Pindolol

Ausgehend von den Ergebnissen der Löslichkeitsstudien bzw. der Komplexbildungseigenschaften des PIN (V.1.2.6.1, Tabelle 21) und unter Berücksichtigung der guten Verträglichkeit von HP- $\beta$ -CD [87] und HP- $\gamma$ -CD [221] wurde PIN mit diesen CD-Derivaten in Lösung gebracht und daraufhin durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup> permeiert.

In CD-haltigem GBR pH 7,4 konnte das schwerlösliche PIN nur 0,15%ig in Lösung gebracht und vergleichend permeiert werden. In dieser Konzentration lag der Wirkstoff sowohl in Gegenwart von 12,5% HP- $\beta$ -CD als auch von 12,5% HP- $\gamma$ -CD vollständig gelöst vor, nicht aber in 12,5%iger HP- $\alpha$ -CD-Lösung, weshalb auf letztere in *In-vitro*-Permeationsstudien zu verzichten war. Das Permeationsverhalten der HP- $\beta$ -CD- und HP- $\gamma$ -CD-haltigen Formulierungen wurde mit dem des Fertigpräparats Pindoptan<sup>®</sup> 0,5% – verdünnt auf 0,15% mit GBR pH 7,4 – verglichen. Tabelle 17 stellt die Permeationsparameter vergleichend dar.

**Tabelle 17: Permeationsparameter für Pindolol (0,15%; aus Pindoptan<sup>®</sup> bzw. 12,5% HP- $\beta$ / $\gamma$ -CD) durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup>**

0,15% Pindolol	$P_{\text{eff}}$ [10 <sup>-6</sup> cm/s]	$Q_{300}$ [%]
Pindoptan <sup>®</sup> , verdünnt	5,24 ± 0,36	4,26 ± 0,24
+ 12,5% HP- $\beta$ -CD	3,33 ± 1,21	2,59 ± 0,44
+ 12,5% HP- $\gamma$ -CD	4,05 ± 0,84	3,99 ± 0,25
+ 12,5% HP- $\gamma$ -CD + BAC	5,97 ± 1,52	5,04 ± 1,31

Mittelwert ± SD (n = 5-8)

Der  $P_{\text{eff}}$  der PIN/HP- $\beta$ -CD-Formulierung beträgt lediglich 64% des  $P_{\text{eff}}$  von Pindoptan<sup>®</sup> und der  $P_{\text{eff}}$  der HP- $\gamma$ -CD enthaltenden PIN-Formulierung 77%, d.h., es besteht eine Tendenz zur Abnahme des  $P_{\text{eff}}$  in Anwesenheit von hydroxypropyliertem  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD, jedoch kein statistisch signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied. Da Pindoptan<sup>®</sup> 0,01% des Konservierungsmittels Benzalkoniumchlorid (BAC) enthält, welches das corneale Epithel schädigen und so als Permeationsverbesserer agieren könnte, wurde eine wässrige Lösung von 0,15% PIN, die außer 12,5% HP- $\gamma$ -CD noch 0,001% BAC (im Vergleich zum verdünnten Fertigpräparat Pindoptan<sup>®</sup> zu niedrig konzentriert! – eine analoge BAC-Konzentration wäre 0,003%) enthielt, geprüft. Sie unterschied sich nicht signifikant zum Handelsprodukt, aber auch nicht

signifikant zu den anderen Werten.

Entsprechend den vorliegenden Resultaten zeigte die PIN/HP- $\beta$ -CD- bzw. die PIN/HP- $\gamma$ -CD-Lösung keine entscheidende Veränderung im Permeationsverhalten *in vitro* im Vergleich mit dem auf analoge Arzneistoffkonzentration verdünnten Handelspräparat Pindoptan<sup>®</sup>, jedoch sind weder ein Retardierungseffekt noch eine höhere effektive Arzneistoffkonzentration völlig auszuschließen. Neben der Löslichkeitsverbesserung des PIN durch die CDe könnte ein weiterer Vorteil in einer möglichen Verminderung der Augenreizung bei Applikation von CD-haltigen Tropfen zu sehen sein [140]. Diskutiert wird auch über den Einsatz von CDe zur Behandlung der Indikation des Trockenen Auges [212]. Da  $\beta$ -Blocker für ihre potentielle Tränenfilmbstörung bekannt sind, könnte eine Rezeptur mit CDe diesbezüglich protektiv wirken.

#### V.1.2.5. Mepindolol / Pilocarpin-Kombinationen

Eine kombinierte Formulierung, die den  $\beta$ -Rezeptorenblocker Mepindololsulfat (MEP) und Pilocarpinhydrochlorid (P) enthielt – wie sie durchaus zur effektiven Glaukomtherapie relevant sein kann – sollte auf die *In-vitro*-Permeation der Wirkstoffe durch isolierte Schweinecornea getestet werden. Analog zum Handelspräparat Timpilo<sup>®</sup>, das eine Kombination aus Timolol und P darstellt (Theoretische Grundlagen, III.3.2.2, Tabelle 7), wurden der  $\beta$ -Blocker 0,5%ig (bezogen auf die Base) und P 2%ig eingesetzt. Ziel dieser Untersuchung war es, festzustellen, ob sich die Arzneistoffe untereinander beeinflussen und somit – verglichen mit einem Monopräparat – zu einer Veränderung im Permeationsverhalten *in vitro* und letztlich der biologischen Verfügbarkeit führen. Darüber hinaus sollte auch in diesem Rahmen der Einfluss der hydroxypropylierten CDe auf die Mono- bzw. die Kombinationsformulierungen evaluiert werden.

Es lagen folgende Ausgangsbedingungen vor: Die relativen Molekülmassen  $M_r$  der beiden Arzneistoffe sind ähnlich (Mepindolol (Base): 262,36; Pilocarpin (Base): 208,3), allerdings liegt die effektive Konzentration von P ca. 3fach über der eingesetzten MEP-Konzentration. Auch die Verteilungskoeffizienten in Octanol/GBR pH 7,4 sind vergleichbar (MEP: 0,79 (Theoretische Grundlagen, III.3.1.1, Tabelle 5), P: 0,62 [202]). Die physiko-chemischen Parameter Viskosität (0,99 bis 1,005 mPas) und Oberflächenspannung (54,8 bis 58,2 mN/m) der Mono-Rezepturen wurden durch den Zusatz der CDe bzw. durch die Kombination beider



Arzneistoffe lediglich geringfügig verändert. Jedoch wurde die Osmolalität durch HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD erhöht. Diese Formulierungen waren hyperton ( $\geq 400$  mOsm/kg), was zur Veränderung der Membranpermeabilität führen könnte. Das Auge toleriert nur eine Osmolalität von ca. 215-430 mOsm/kg [232], sodass die getesteten Lösungen im Grenzbereich der Verträglichkeit lagen und für eine mögliche Anwendung *in vivo* entsprechend modifiziert werden müssten.

Der  $P_{\text{eff}}$  von P wurde mit  $2,46 \pm 0,81 \cdot 10^{-6}$  cm/s bestimmt, entsprechend einer prozentualen Freisetzungsrates von  $1,97 \pm 0,50$  % nach 300 min. Ein Zusatz von 12,5% HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD zu einer 2%igen P-Lösung änderte deren Permeation nicht signifikant. Tendenziell führten HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD jedoch zu einer Steigerung der Werte für Schweinecornea<sup>E</sup>. Letztere zeigt sich deutlicher in der signifikanten Zunahme der kumulativ freigesetzten Arzneistoffmenge nach 300 min ( $Q_{300}$ ; Tabelle 18, Abb. 20).

Im Gegensatz dazu führten Versuche mit Schweinecornea<sup>T</sup>, die analog durchgeführt wurden, zu einer signifikanten Abnahme des  $P_{\text{eff}}$  für die HP- $\beta$ -CD- bzw. HP- $\gamma$ -CD-haltigen P-Formulierungen (Tabelle 19). Dieses Ergebnis korreliert mit den zuvor beschriebenen, unterschiedlichen Permeationsparametern von MEP, ebenfalls als Mono-Wirkstoff-Formulierung, bei Verwendung von Schweinecornea<sup>E</sup> bzw. Schweinecornea<sup>T</sup> (V.1.2.3, Tabellen 15 und 16). Die Ursachen hierfür bleiben jedoch ungeklärt, da eine weitere, vergleichende Charakterisierung des Ausgangsmaterials aufgrund der Schließung des Schlachthofs Eberswalde nicht mehr möglich war (Material und Methoden, VI.2.4.1). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für MEP (V.1.2.3, Tabellen 15 und 16) resultierte für die P-Referenz (CD-freier Wert) ebenfalls ein höherer Wert bei Anwendung von Schweinecornea<sup>T</sup> gegenüber -cornea<sup>E</sup>, der allerdings nicht signifikant ist (Tabelle 19).

In der Literatur liegen durchaus vergleichbare Werte für die  $P_{\text{eff}}$  von P aus 2%iger Lösung durch biologische Membranen vor (isolierte Schweinecornea<sup>E</sup>:  $2,54 \pm 0,75 \cdot 10^{-6}$  cm/s [202] (vgl. Tabelle 18); isolierte Rindercornea:  $4,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s [92] bzw.  $1,6 \cdot 10^{-6}$  cm/s [207]; isolierte Kaninchencornea:  $2,8 \cdot 10^{-6}$  cm/s [218]). JÄRVINEN et al. [92] zeigten, dass bei Zusatz von HP- $\beta$ -CD (0,25%) zum Donator der  $P_{\text{eff}}$  nicht signifikant verringert wird ( $3,55 \cdot 10^{-6}$  cm/s gegenüber  $4,05 \cdot 10^{-6}$  cm/s;  $n = 3$ ), was keinen entscheidenden Einfluss des zugefügten CDs in der getesteten Konzentration erkennen lässt.

**Tabelle 18: Permeationsparameter von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup> (<sup>1</sup>Schweinecornea<sup>T</sup>) sowie in Gegenwart von Mepindolol (MEP, 0,5% – bezogen auf die Base) und 12,5% hydroxy-propyliertem  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin (CD)**

Pilocarpin (P)	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}\text{cm/s}$ ]	$Q_{300}$ [%]
sine CD	$2,46 \pm 0,81$	$1,97 \pm 0,50$
+ HP- $\alpha$ -CD	$2,47 \pm 1,57$	$2,23 \pm 1,41$
+ HP- $\beta$ -CD	$3,57 \pm 0,18$	$3,22^* \pm 0,17$
+ HP- $\gamma$ -CD	$3,20 \pm 0,29$	$2,88^* \pm 0,27$
Kombination mit MEP (P/MEP); sine CD	$5,35 \pm 2,24$	$5,53 \pm 2,46$
+ HP- $\alpha$ -CD	$2,01 \pm 1,43$	$1,79^* \pm 1,86$
+ HP- $\beta$ -CD	$1,74^* \pm 0,84$	$1,52^* \pm 0,76$
+ HP- $\gamma$ -CD	$2,07^* \pm 0,95$	$3,15^* \pm 0,74$
-----		
Cornea vorbehandelt mit 0,5% MEP <sup>1</sup>		
sine CD	$2,67 \pm 1,11$	$2,17 \pm 0,94$

Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9); \*signifikant gegenüber Referenz (sine CD); p < 0,05 (t-Test)

In Gegenwart von MEP (Tabelle 18, Abb. 20, Schweinecornea<sup>E</sup>) kam es zu einer signifikanten Verdopplung von  $P_{\text{eff}}$  für P ( $5,35 \pm 2,24 \cdot 10^{-6}\text{cm/s}$ ) bei allerdings relativ hoher Standard-abweichung von 41,9% gegenüber 32,9% im MEP-freien Versuch. Auch aus den Versuchen mit den CDen ergab sich ein deutlich erhöhter Fehler bei der P/MEP-Kombination. Dennoch unterscheiden sich die für P in Kombination mit MEP errechneten  $P_{\text{eff}}$  bei Anwesenheit von 12,5% HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD gegenüber der Referenz (P/MEP) signifikant (p < 0,05) (Tabelle 18, Abb. 20).

**Tabelle 19: Permeationsparameter von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> (ohne/ mit 12,5% HP- $\beta$ / $\gamma$ -CD)**

P	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}\text{cm/s}$ ]	$Q_{300}$ [%]
sine CD	$3,19 \pm 0,46$	$2,80 \pm 0,47$
+ HP- $\beta$ -CD	$1,48^* \pm 0,47$	$1,09^* \pm 0,34$
+ HP- $\gamma$ -CD	$1,53^* \pm 0,71$	$1,31^* \pm 0,68$

Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9); \*signifikant zur Referenz (sine CD) für p < 0,05 (t-Test)

Um die gefundene tendenzielle Zunahme der P-Verfügbarkeit in Gegenwart von MEP (CD-freier Donator) zu hinterfragen, wurde die Schweinecornea<sup>T</sup> mit 0,5%iger (bezogen auf die Base) MEP-Lösung vorbehandelt (Material und Methoden, VI.2.4) und durch diese anschließend eine 2%ige P-Lösung permeiert. Im Ergebnis beeinflusste diese Vorbehandlung der Membran die P-Permeabilität ( $2,67 \pm 1,11 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ ), verglichen mit der unbehandelten Membran ( $2,46 \pm 0,81 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$ ), nicht signifikant<sup>1</sup>.

Für die Zunahme der P-Permeabilität in Kombination mit MEP ist demnach eher eine Interaktion zwischen beiden Arzneistoffen anzunehmen, die auch Ursache für die hohe Standardabweichung sein kann. Es sollte insofern in Betracht gezogen werden, dass bei Anwendung von Augentropfen in dieser Kombination eine corneale Permeationszunahme von P nicht auszuschließen ist.

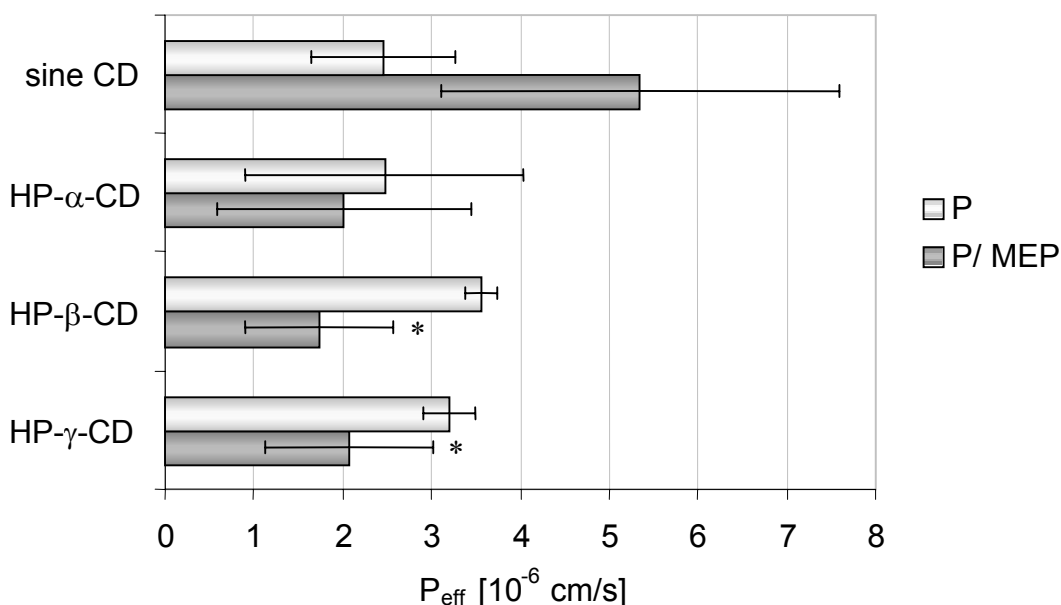
Diese Hypothese steht nicht im Widerspruch zu den in der Literatur berichteten *In-vivo*-Studien mit  $\beta$ -Blocker/P-Kombinationen. So konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Glaukombehandlung durch feste Kombinationen von Betablockern mit P zu verbessern war. ZADOK et al. [247] stellten fest, dass der IOP bei lokaler Anwendung einer Timolol/P-Kombination wesentlich niedriger lag als bei Einzelanwendung von Timolol bzw. P. Außerdem wiesen DRAGO et al. [48] nach, dass der Wirkstoff Metipranolol in Kombination mit P effektiver den IOP senkt und zu weniger bradykardialen Nebenwirkungen führt als eine Timolol/P-Formulierung. Dagegen zeigte eine weitere klinische Studie mit Carteolol in Kombination mit P im Vergleich zu einer Timolol/P-Kombination bei der Behandlung des Offenwinkelglaukoms oder der okulären Hypertension keine wesentliche Verbesserung hinsichtlich der IOP-Senkung [22].

In der aktuellen Fachinformation des Präparats Timpilo<sup>®</sup>, einer Timolol/P-Kombination [56], wird bezüglich der Wechselwirkungen gesagt, dass die augeninnendrucksenkende Wirkung von timololhaltigen Augentropfen durch die Gabe von adrenalin- und pilocarpinhaltigen Augentropfen verstärkt wird. (In diesem Zusammenhang würde man allerdings eine höhere

---

<sup>1</sup>Diese Aussage ist kritisch zu werten, da der P-Permeationsversuch nach Vorbehandlung mit MEP nur durch Schweinecornea<sup>T</sup> und nicht wie die gesamte Versuchsreihe durch Schweinecornea<sup>E</sup> durchgeführt werden konnte.

Permeationsrate des Betablockers erwarten.) Außerdem senkt Timpilo® bei 2-mal täglicher Gabe den Augeninnendruck vergleichbar einer gleichzeitigen Verabreichung von Timolol-Augentropfen bei 2-mal täglicher Gabe und Pilocarpin-Augentropfen 4-mal täglich in entsprechenden Konzentrationen [56]. Systematische Studien an derartigen  $\beta$ -Blocker/Pilocarpin-Formulierungen, auch im Hinblick auf deren Wirkstoffkonzentration, fehlen allerdings in der Literatur.



**Abb. 20: Permeabilitätskoeffizienten von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) allein und in Kombination mit 0,5% (bezogen auf die Base) Mepindololsulfat (MEP) ohne/ unter Zugabe von 12,5% HP- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -CD (Schweinecornea<sup>E</sup>); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9); \*signifikant gegenüber der jeweiligen Referenz (sine CD); p < 0,05 (t-Test)**

Tabelle 20 fokussiert die Permeation von MEP, indem wieder die Formulierungen ohne und mit Hydroxypropyl-CDen sowie in Kombination mit P betrachtet werden. Der  $P_{eff}$  von MEP allein ( $2,52 \pm 0,54 \cdot 10^{-6}$  cm/s) liegt in der Größenordnung des P ( $2,46 \pm 0,81 \cdot 10^{-6}$  cm/s). Durch Zusätze von 12,5% HP- $\alpha$ -CD bzw. HP- $\beta$ -CD erhöhte sich die MEP-Permeation, wobei sich jedoch lediglich für HP- $\beta$ -CD eine Signifikanz (Tabelle 19) errechnete (s. auch V.1.2.3, Tabellen 15 und 16). Berücksichtigt werden muss dabei allerdings die in Gegenwart von 12,5% HP- $\beta$ -CD nachgewiesene „lag time“ für MEP von 90 min. Eine verzögerte Arzneistofffreisetzung trat bei der Referenz nicht auf.

**Tabelle 20: Permeationsparameter von 0,5% (berechnet auf die Base) Mepindololsulfat (MEP) durch isolierte Schweinecornea<sup>E</sup> sowie in Gegenwart von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) und 12,5% hydroxypropyliertem  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin (CD)**

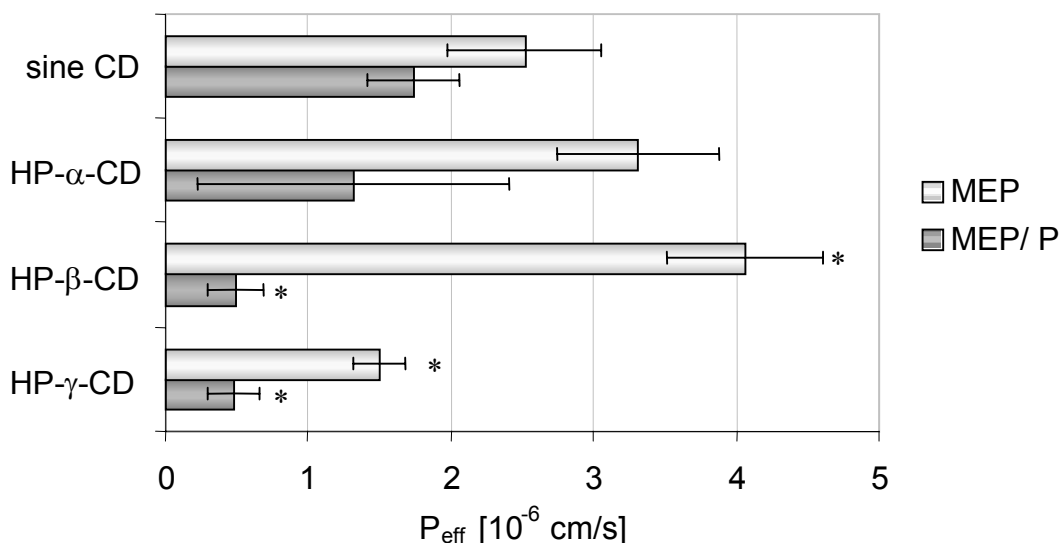
MEP	$P_{\text{eff}}$ [ $10^{-6}$ cm/s]	$Q_{300}$ [%]
sine CD	$2,52 \pm 0,54$	$2,09 \pm 0,50$
+ HP- $\alpha$ -CD	$3,31 \pm 0,57$	$2,70 \pm 0,41$
+ HP- $\beta$ -CD	$4,37^{1*} \pm 0,55$	$3,19^* \pm 0,68$
+ HP- $\gamma$ -CD	$1,50^* \pm 0,18$	$2,01 \pm 0,41$
Kombination mit P (MEP/P)		
sine CD	$1,74 \pm 0,32$	$1,97 \pm 0,43$
+ HP- $\alpha$ -CD	$1,32 \pm 1,09$	$0,60^* \pm 0,18$
+ HP- $\beta$ -CD	$0,49^* \pm 0,19$	$0,52^* \pm 0,10$
+ HP- $\gamma$ -CD	$0,48^* \pm 0,18$	$0,54^* \pm 0,11$

Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9); \*signifikant zur Referenz (sine CD) für  $p < 0,05$  (t-Test), <sup>1</sup>lag time: 90 min (Für die anderen  $P_{\text{eff}}$  existiert keine lag time.)

In das Konzept von CD-Einschlussverbindungen, das eine Abnahme der Permeabilitätsrate erwarten ließe, passt das bei Zusatz von 12,5% HP- $\gamma$ -CD ermittelte Ergebnis mit signifikant verminderter (ca. 1,5fach) MEP-Permeation gegenüber der hilfstofffreien MEP-Formulierung. Aufgrund dieses Resultats ist eine Interaktion zwischen MEP und HP- $\gamma$ -CD im Donatormedium zu vermuten.

Der Vergleich der CD-freien Referenzwerte für MEP alleine und in Kombination mit P ergibt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ), die entsprechende Berechnung für die kumulativ freigesetzten Arzneistoffmengen nach 300 min hingegen nicht (Tabelle 20).

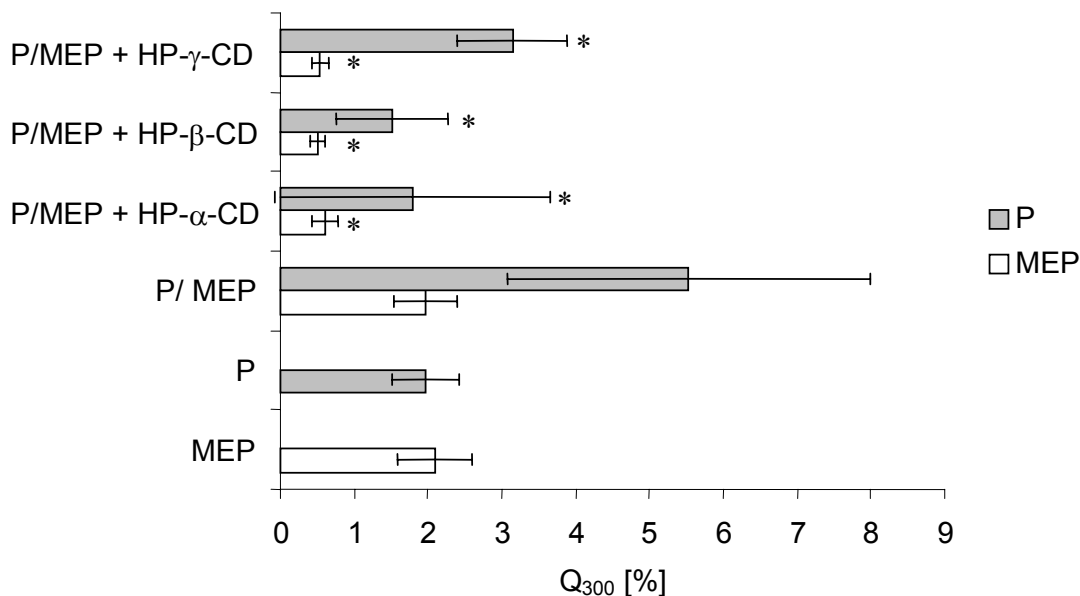
Die Kombination MEP/P führte generell zu einer  $P_{\text{eff}}$ -Reduzierung gegenüber dem jeweiligen MEP-Wert (Tabelle 20), zeigte aber nur für HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD Signifikanz. Alle MEP/P- $P_{\text{eff}}$ -Werte lagen deutlich unter dem MEP-Wert ohne CD und ohne P ( $2,52 \pm 0,54 \cdot 10^{-6}$  cm/s) und ergaben eine Abnahme in folgender Reihenfolge: MEP/P sine CD > HP- $\alpha$ -CD >> HP- $\beta$ -CD = HP- $\gamma$ -CD. Dabei resultiert für den Zusatz des HP- $\alpha$ -CD zur MEP/P-Kombination keine Signifikanz,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hydroxypropyl-CD sind im Vergleich zu den entsprechenden P-freien MEP-Daten nicht signifikant verschieden.



**Abb. 21: Permeabilitätskoeffizienten von 0,5% Mepindolol (MEP) allein und in Kombination mit 2% Pilocarpin (P) unter Zugabe von 12,5% HP- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -CD (Schweinecornea<sup>E</sup>); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9); \*signifikant gegenüber der jeweiligen Referenz (sine CD) für  $p < 0,05$  (t-Test)**

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die hydroxypropylierten CDe, insbesondere HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD deutlichen Einfluss auf die *In-vitro*-Verfügbarkeit von MEP nehmen (Tabelle 20, Abb. 21) und in Kombination mit P zu signifikant verminderten  $P_{eff}$  führen. Dieses Phänomen könnte eine Arzneistoffretardierung und folglich eine verlängerte Wirkungsdauer verursachen. Rückschlüsse auf die *In-vivo*-Verfügbarkeit sowie auf eine sinnvolle ophthalmologische Anwendung lassen sich daraus allerdings nur unter Vorbehalt ziehen.

Die Gegenüberstellung der prozentual freigesetzten Arzneistoffe aus den Mono- und Kombinationsformulierungen sowie bei Anwesenheit der CDe in letzteren (Abb. 22) verdeutlicht, dass Wechselwirkungen der Arzneistoffe untereinander bzw. mit den Hilfsstoffen sehr wahrscheinlich sind. Die Abnahme des  $Q_{300}$ -Wertes in Anwesenheit hydroxypropylierter CDe in der Kombination ist sowohl für MEP als auch für P signifikant. Für MEP ergibt sich eine ca. 3,5fache Abnahme der prozentual freigesetzten Arzneistoffmenge aus allen drei CD-Formulierungen. Auch für P errechnet sich Signifikanz, allerdings liegen hier die Fehler sehr hoch (Abb. 22).



**Abb. 22: Arzneistofffreisetzung  $Q_{300}$  [%] von Mepindolol (MEP) und Pilocarpin (P) nach 300 min (Schweinecornea<sup>E</sup>); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5-9);**  
 \*signifikant zum jeweiligen Wert in P/MEP für  $p < 0,05$  (Single-Factor-ANOVA)

Der relativ geringe Fehler für die Monolösungen P und MEP (Abb. 22) ist möglicherweise vorwiegend auf alternierende Wechselwirkungen mit der biologischen Membran bzw. auf deren unterschiedliche Beschaffenheit zurückzuführen. Die vergleichsweise hohen Fehler der Kombinationslösungen für  $Q_{300}$ , insbesondere bei der Berechnung der P-Werte, könnten auf Arzneistoff-Arzneistoff-Wechselwirkungen vor der Membran sowie (zumindest teilweise) auf Konkurrenzreaktionen um die jeweiligen CD-Derivate zurückzuführen sein. Um diese möglichen Fehlerquellen bzw. Einflussparameter zu differenzieren, wären entsprechende Versuche an einer indifferenten künstlichen Membran (z.B. Nephrophan<sup>®</sup> = regenerierte Cellulose) hilfreich.

Ausgehend von den Ergebnissen der *In-vitro*-Permeation ist eine Komplexbildung zwischen P bzw. MEP mit HP-α-CD sowohl für die Mono-Formulierung als auch für die Kombination eher unwahrscheinlich. Jedoch kann aufgrund dieser Daten eine Interaktion von MEP mit HP-β-CD bzw. HP-γ-CD angenommen werden (Tabelle 20, Abb. 21). Letzteres gilt sowohl für MEP allein als auch in Kombination mit P. Auf welche Weise diese Wechselwirkungen erfolgen, bleibt offen.

#### V.1.2.6. Wechselwirkungen mit Cyclodextrinen

Im Folgenden sollten diskutierte Wechselwirkungen von MEP und PIN mit ausgewählten CDen (s. Theoretische Grundlagen, III.4.1.1, Tabelle 9) als Ursache für Permeationsveränderungen genauer untersucht werden. Da PIN als hydrophobe Base vorlag, war eine Komplexcharakterisierung in wässriger Lösung durch Löslichkeitsisothermen möglich. Es konnten Stabilitätskonstanten (Untersuchungen, IV.2) errechnet werden. Gegebenenfalls sollten durch das Komplexierungsverhalten von PIN in wässriger Lösung Rückschlüsse auf das strukturverwandte MEP gezogen werden.

Für MEP selbst wurden feste CD-Komplexe hergestellt und mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und Röntgendiffraktometrie (X-RD) charakterisiert.

##### V.1.2.6.1. Pindolol

Um Wechselwirkungen zwischen dem schwerlöslichen Pindolol (PIN) (Wasserlöslichkeit: 0,16 mg/ml) und CDen zu erfassen, wurden zunächst Löslichkeitsstudien in Wasser (pH 6,3) durchgeführt. Neben den nativen und hydroxypropylierten  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CDen kamen ein nichtionisches  $\alpha$ -CD-Polymer ( $\alpha$ -CD-Pol) sowie das ionische carboxymethylierte  $\alpha$ -CD-Polymer (CM- $\alpha$ -CD-Pol) zur Anwendung.

Die Löslichkeitsisothermen zeigten unterschiedliche Kurvenverläufe (vgl. Abb. 13). Bei  $\alpha$ -CD ergibt sich der B<sub>S</sub>-Typ; HP- $\beta$ -CD folgt dem A<sub>P</sub>-Typ. Alle anderen Löslichkeitsisothermen (HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD,  $\alpha$ -CD-Pol, CM- $\alpha$ -CD-Pol) repräsentieren mehr oder weniger den A<sub>L</sub>-Typ, d.h. die Entstehung von 1:1-Komplexen kann angenommen werden.

Die im überprüften CD-Konzentrationsbereich ermittelten Stabilitätskonstanten (19,0 - 2018,1 l/mol) für PIN/CD-Komplexe in Wasser sind vergleichsweise sehr niedrig (Tabelle 21). Die beste Wasserlöslichkeit und höchste Komplexbildungskonstante von PIN wurde durch CM- $\alpha$ -CD-Pol erreicht, wobei jedoch ionische Wechselwirkungen zwischen dem Arznei- und Hilfsstoff dominieren dürften. Da bisher noch keine Daten zur okularen Toleranz oder Toxizität dieses ionischen Polymers vorliegen und nicht genügend Substanz zur Verfügung stand, wurde zunächst von weiteren Untersuchungen Abstand genommen. Gleiches gilt für das ebenfalls für weitere Versuche interessante nichtionische Polymer ( $\alpha$ -CD-Pol).



**Tabelle 21: Stabilitätskonstanten von Pindolol (PIN)/Cyclodextrin (CD)-Komplexen**

CD	Typ	K <sub>Stab</sub> [l/mol]	R <sup>2</sup>	c <sub>S</sub> PIN bei CD <sub>10%</sub> [mg/ml]	Faktor <sup>1</sup> [CD <sub>10%</sub> : CD <sub>0%</sub> ]
α-CD	B <sub>S</sub>	65,6	1,00*	0,58	3,63
HP-α-CD	A <sub>L</sub>	19,0	0,99	0,25	1,56
β-CD	A <sub>L</sub>	604,7	0,92	x)	x)
HP-β-CD	A <sub>P</sub>	63,8	0,95*	0,41	2,56
γ-CD	A <sub>L</sub>	53,7	0,98	0,65	4,06
HP-γ-CD	A <sub>L</sub>	51,3	0,96	0,65	4,06
α-CD-Pol	A <sub>L</sub>	312,5	0,98	1,76	11,0
CM-α-CD-Pol	A <sub>L</sub>	2018,1	0,99	6,38	39,9

<sup>1</sup>Faktor für Löslichkeitsverbesserung gegenüber Wasser (pH 6,3); Löslichkeit von PIN in Wasser: 0,16 mg/ml;

R<sup>2</sup>: Korrelationskoeffizient der entsprechenden Geradengleichung (lineare Regression);

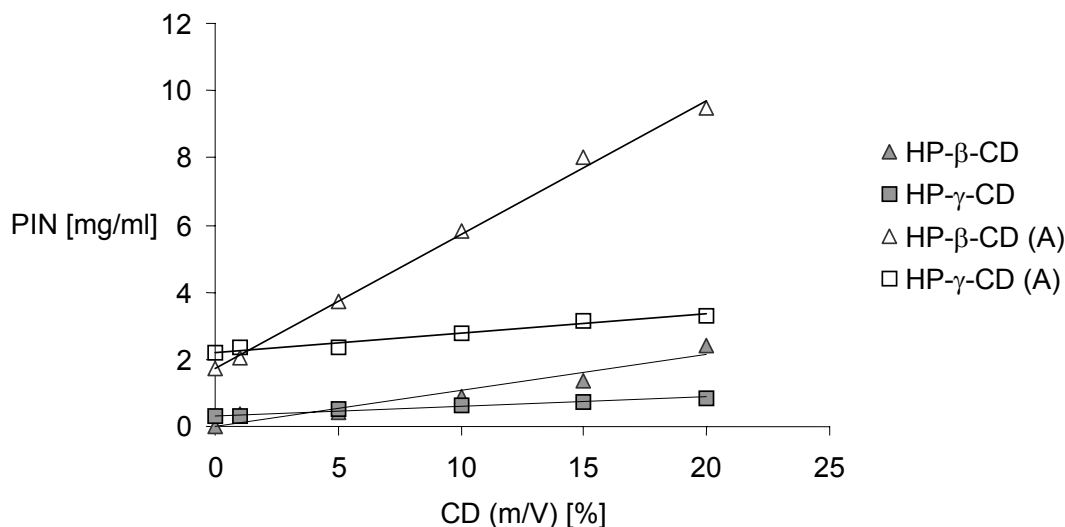
c<sub>S</sub> = Sättigungslöslichkeit; x) nicht durchführbar (β-CD-Löslichkeit < 10%);

\*berechnet im Geradenabschnitt; n = 3

Die Löslichkeit (c<sub>S</sub>) in den nativen CDen (ausgenommen β-CD) und ihren Hydroxypropyl-derivaten in 10%iger Konzentration (realistisch für die Formulierung eines Ophthalmikums) unterscheidet sich nicht wesentlich und liegt im Bereich von 0,25-0,65 mg/ml. Im Zusammenhang mit β-CD muss die sehr begrenzte Löslichkeit des β-CDs selbst (1,85 g/100 ml) in Betracht gezogen werden.

Weitere Löslichkeitsstudien erfolgten in GBR-Puffer pH 7,4 bei Raumtemperatur sowie durch Erhitzen im Autoklaven. Diese Versuche beschränkten sich auf hydroxypropyliertes β- und γ-CD. Die erzielten Sättigungslöslichkeiten (c<sub>S</sub>) in Wasser, Puffer und Puffer (nach Autoklavierung) sind in Tabelle 22 vergleichend gegenüber gestellt.

Unter Zusatz von HP-β-CD erwies sich das Puffermedium (GBR pH 7,4) generell als vorteilhafter für die PIN-Löslichkeit. Gegenüber Wasser pH 6,3 war die Löslichkeit mit 10% HP-β-CD etwa verdoppelt (Tabelle 22). Im Gegensatz dazu blieb die PIN-Löslichkeit in GBR pH 7,4 unter HP-γ-CD-Zusatz bis 10% unverändert (Tabelle 21); in höheren Konzentrationen (15 bzw. 20% HP-γ-CD) erfolgte sogar eine verminderte Löslichkeit gegenüber Wasser.



**Abb. 23: Löslichkeitsisothermen von Pindolol (PIN) in GBR-Puffer pH 7,4;  
(A): nach Autoklavieren (121°C, 200 kPa, 15 min); n = 3**

In Anlehnung an Untersuchungen von LOFTSSON et al. [107, 121, 124] ließ sich die Löslichkeit von PIN durch Autoklavieren einer PIN/HP-γ-CD- bzw. PIN/HP-β-CD-Zubereitung in GBR-Puffer wesentlich steigern (Tabelle 22), z.B mit 20% HP-γ-CD auf das 20fache und mit 20% HP-β-CD sogar auf das 58fache (Tabelle 22) gegenüber Wasser ohne CD. Auch in der eher ophthalmologisch relevanten Konzentration von 10% HP-β/γ-CD zeigte sich das β-Derivat hinsichtlich der Löslichkeitsverbesserung von PIN ebenfalls deutlich überlegen (35,7fach gegenüber 16,9fach durch HP-γ-CD). Diese Ergebnisse lassen zudem auf eine höhere Komplexierungstendenz (bei Hitzeeinwirkung im Autoklaven) des PIN mit HP-β-CD gegenüber HP-γ-CD schließen.

Weiterhin fällt auf, dass im Zusammenhang mit HP-β-CD die in GBR bestimmten Sättigungskonzentrationen zu deutlich höheren Werten im Vergleich zu Wasser führten (Tabelle 22). Neuere Studien [126] haben gezeigt, dass Arzneistoff/CD-Komplexe häufig eine recht komplizierte Zusammensetzung und Struktur aufweisen. Es wird postuliert, dass solche Komplexe in einigen Fällen aus einer Mischung von Einschlusskomplexen und Nicht-Einschlusskomplexen (z.B. Seitenkettenassoziaten) bestehen. Weiterhin können Arzneistoff/CD-Komplexe auch Aggregate bilden, die aus Hunderten von Einzelkomplexen bestehen.

**Tabelle 22: Löslichkeit ( $c_s$ ) von Pindolol durch hydroxypropyliertes  $\beta/\gamma$ -Cyclodextrin (CD) im Vergleich**

HP $\beta$ CD [%]	Löslichkeit [mg/ml]			Löslichkeitsverhältnis		
	$c_{S/W}$	$c_{S/P}$	$c_{S/A}$	$c_{S/A}/c_{S/W}$	$c_{S/A}/c_{S/P}$	$c_{S/A}/c_{S/W0\%CD}$
0	0,16	0,17	1,97	-	-	-
1	0,19	0,35	2,06	11,0	5,9	12,6
5	0,31	0,44	3,69	12,0	8,5	22,7
10	0,41	0,88	5,82	14,1	6,6	35,7
15	0,72	1,35	8,01	11,1	5,9	49,2
20	1,75	2,41	9,47	5,4	3,9	58,2
R <sup>2</sup>	0,95	0,94	0,97			
HP $\gamma$ CD [%]	Löslichkeit [mg/ml]			Löslichkeitsverhältnis		
	$c_{S/W}$	$c_{S/P}$	$c_{S/A}$	$c_{S/A}/c_{S/W}$	$c_{S/A}/c_{S/P}$	$c_{S/A}/c_{S/W0\%CD}$
0	0,16	0,17	1,97	-	-	-
1	0,31	0,31	2,33	7,4	7,5	14,3
5	0,60	0,50	2,37	4,0	4,7	14,6
10	0,65	0,63	2,75	4,2	4,3	16,9
15	0,92	0,71	3,13	3,4	4,4	19,3
20	1,20	0,86	3,30	2,8	3,8	20,3
R <sup>2</sup>	0,96	0,98	0,99			

$c_{S/W}$ : Löslichkeit in Wasser pH 6,3 bei Raumtemperatur ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ); n = 3

$c_{S/P}$ : Löslichkeit in GBR-Puffer pH 7,4 bei Raumtemperatur ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ); n = 3

$c_{S/A}$ : Löslichkeit in GBR-Puffer pH 7,4 nach Autoklavieren ( $121^\circ\text{C}$ , 200 kPa, 15 min); n = 3

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen von LOFTSSON et al. [126] eine deutliche Löslichkeitsverbesserung von Hydrocortison/ $\beta$ -CD durch Zusatz kurzkettiger anionischer bzw. kationischer organischer Salze zum wässrigen Medium. In den vorliegenden Studien mit PIN könnten möglicherweise Substanzen, die in GBR-Puffer enthalten sind (Material und Methoden, VI.1), eine löslichkeitsfördernde Funktion übernehmen. Letzteres genauer zu untersuchen, wäre ein interessanter Ansatzpunkt für Folgearbeiten.

#### V.1.2.6.2. Mepindolol

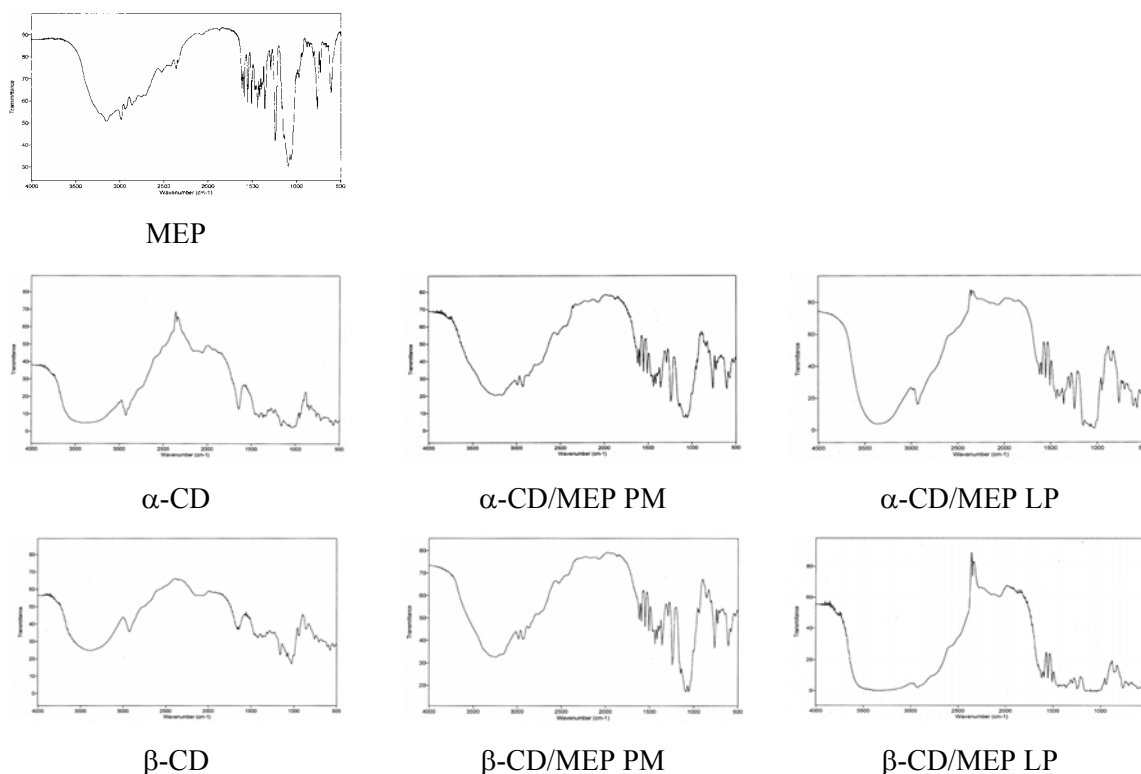
Als Beispiel für die eingesetzten hydrophilen  $\beta$ -Blocker-Salze und als Erklärungsversuch für

die Permeationsphänomene (V.1.2) wurden von MEP mit  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -CD auf dem Wege der Lyophilisation und durch Physikalische Mischungen (Material und Methoden, VI.2.3.1) Feste Dispersionen erzeugt und versucht, diese mittels X-RD und FT-IR (Material und Methoden, VI.2.3.2.2 und VI.2.3.2.1) zu charakterisieren.

Die Anwendung der X-RD zum Nachweis eines Kavitäts [51, 53, 64, 65, 101, 154, 167, 192] im festen Zustand beruht auf der Ausbildung einer anderen Kristallmodifikation bzw. des amorphen Zustands des betreffenden Arzneistoffs. Liegt aber die Ausgangsverbindung bereits amorph vor, lassen sich in der Regel keine Aussagen treffen. Die meisten bisher untersuchten Kavitate mit Derivaten der nativen CDe weisen röntgenamorphe Strukturen auf.

Im vorliegenden Fall wurde der kristallin vorliegende Arzneistoff MEP selbst (sowie das ebenfalls kristalline  $\alpha$ -CD [220]) durch den Gefriertrocknungsprozess in den amorphen Zustand überführt. Demzufolge waren auch aus den Röntgendiffraktogrammen der Lyophilisate (LP) (MEP/ $\alpha$ -CD im molaren Verhältnis 1:1 und 1:2) keine Hinweise auf Komplexbildung durch Änderung der Kristallstruktur zu entnehmen. Die entsprechenden Physikalischen Mischungen (PM) von MEP/ $\alpha$ -CD lagen kristallin vor. Letztere ließen ebenfalls nicht auf Komplexbildung schließen.

Die FT-IR als gelegentlich verwendete Methode zur Komplexcharakterisierung zwischen Arzneistoffen und CDen [33, 95, 116] führt nicht immer zu interpretierbaren Ergebnissen. Im vorliegenden Fall wurde versucht, sie für orientierende Aussagen über mögliche Assoziante heranzuziehen. Die Absorptionsbanden (Abb. 24) im Bereich der Wellenzahlen 3700 - 2500  $\text{cm}^{-1}$  repräsentieren die OH-Schwingungen des jeweiligen Moleküls (zusätzliche OH-Schwingung im Bereich 1400 - 1000  $\text{cm}^{-1}$ ). Die Wellenzahlen 3500-2200  $\text{cm}^{-1}$  stellen die NH-Schwingungen des MEP-Moleküls dar [41, 189]. Entsteht ein Arzneistoff/CD-Kavität durch nicht-kovalente Bindungen des Gastmoleküls an die OH-Gruppen im Hohlraum des CD-Moleküls, ist eine Verbreiterung der OH-Bande („inhomogene Verbreiterung“ durch Vorliegen von freiem Arzneistoff und Arzneistoff/CD-Komplex) zu erwarten. Sowohl die Physikalischen Verreibungen als auch die Lyophilisate führten lediglich zu einfachen Überlagerungen des MEP-Spektrums mit dem CD-Spektrum (Abb. 24). Die Existenz eines MEP/CD-Komplexes kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 24: FTIR-Spektren von MEP/  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD (1 : 1); Ordinate: Transmission [%], Abszisse: Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]; PM = Physikalische Mischung, LP = Lyophilisat**

Um eindeutige Aussagen über eine mögliche Komplexbildung zwischen MEP und den nativen CDe machen zu können, müssten noch weitere Methoden zur Komplexcharakterisierung wie z.B. die Protonenresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR) [33, 51, 64, 65, 95, 167], die UV/VIS-Spektroskopie [68] oder die HPLC [59] herangezogen werden.

### V.1.3. *Corneale Verträglichkeit*

Die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) kann herangezogen werden, um Veränderungen der cornealen Epitheloberfläche sichtbar zu machen. Diese können z.B. durch in Ophthalmika verwendete Substanzen (Arzneistoffe, Konservierungsmittel, Hilfsstoffe) verursacht werden und u.a. zum Verlust bzw. zur Verkleinerung der Oberflächenmikrovilli, zu einer Störung im Aufbau der Zellmembranen, zum Klumpen der Tonofilamente sowie zum Loslösen der Oberflächenepithelzellen führen [158]. Hinterfragt wurden in dieser Arbeit in erster Linie die CDe.

Mittels REM wurden  $\alpha$ -CD in den drei bei den Permeationsversuchen eingesetzten Konzentrationen (1,85/ 3,7/ 10%), sein Hydroxypropylderivat (4,7/ 11,7%) sowie 12,5% HP- $\beta$ -CD im Vergleich zum Lösungsmedium GBR pH 7,4 (Referenz) auf ihre epitheliale Kompatibilität getestet. Außerdem gelangte das Handelspräparat Pindoptan<sup>®</sup> zur Überprüfung. Hierzu wurde isolierte Schweinecornea<sup>E</sup>, wie unter Material und Methoden, VI.2.8, beschrieben, vorbehandelt.

Die elektronenmikroskopischen Bilder (Abb. 25) zeigen weder für HP- $\alpha$ -CD noch für HP- $\beta$ -CD manifeste Veränderungen gegenüber der Referenz. Auch für das Fertigpräparat Pindoptan<sup>®</sup> ließen sich im Vergleich zu GBR pH 7,4 keine epithelialen Schädigungen erkennen. Im Gegensatz dazu schien bereits die Vorbehandlung des cornealen Epithels mit nur 1,85%  $\alpha$ -CD eine Mikroerosion der Oberflächenepithelzellen zu bewirken. Die REM-Aufnahme mit 3,7%  $\alpha$ -CD zeigt dagegen keinen deutlichen Unterschied zur Referenz (GBR pH 7,4), während die Behandlung der Gewebe mit 10%  $\alpha$ -CD zur Kraterbildung führte, welche als Schädigung des cornealen Epithels zu interpretieren ist. KANAI et al. [96] überprüften das Immunsuppressivum Cyclosporin in Gegenwart von  $\alpha$ -CD (1/ 2/ 4/ 8%) auf corneale Verträglichkeit mittels REM, Lichtmikroskopie sowie mittels Draize-Test. Die Autoren konstatierten, dass  $\alpha$ -CD in 4%iger Konzentration (Cyclosporinkonzentration 0,025%) die geringste corneale „Toxizität“ aufweist, was mit den vorliegenden Resultaten im Einklang zu stehen scheint<sup>2</sup>. Ferner belegen REM-Untersuchungen von JANSEN et al., dass 12,5% HP- $\beta$ -CD für das corneale Epithel nicht toxisch ist [87].

Der Einsatz von  $\alpha$ -CD ist aufgrund der bereits in der Literatur dokumentierten Erkenntnisse [207] generell kritisch zu beurteilen, jedoch deuten die vorliegenden REM-Daten an, dass offensichtlich eine starke Konzentrationsabhängigkeit besteht und CD-Konzentrationen um 4% eine vergleichsweise bessere Kompatibilität aufweisen als niedrigere und höhere Konzentrationen. Überprüfungen im größeren Umfang und nach wiederholter Applikation wären erforderlich.

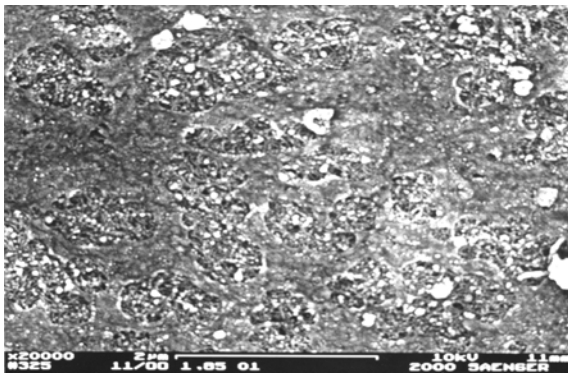
Um eindeutigere Aussagen über die corneale Verträglichkeit machen zu können, müsste auch

---

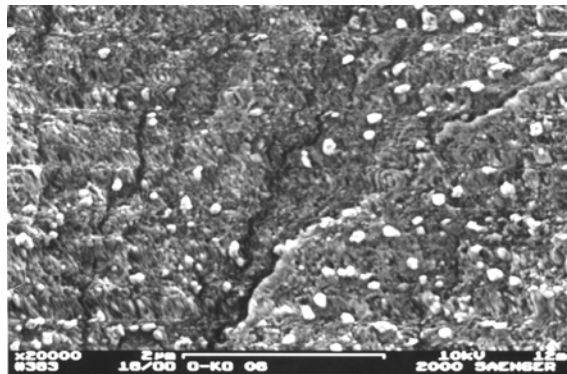
<sup>2</sup>Diese Aussage ist in sofern kritisch zu bewerten, da bei den Versuchen von KANAI et al. die Toxizitätsuntersuchungen zusammen mit dem Arzneistoff Cyclosporin durchgeführt wurden.

das corneale Endothel auf die gleiche Art und Weise untersucht werden. DUNCKER et al. [49] untersuchten Veränderungen des cornealen Endothels von Schweineaugen nach Einwirkung des ansonsten als gut verträglich beschriebenen HP- $\beta$ -CDs in unterschiedlicher Konzentration. Bei einer Konzentration von 10% HP- $\beta$ -CD wurden manifeste Veränderungen, wie z.B. eine Verminderung der Zelldichte, beobachtet.

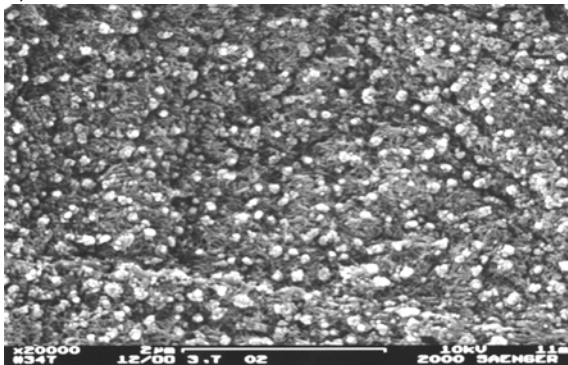
In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass zumindest Schädigungen des cornealen Epithels – selbstverständlich in Abhängigkeit von Art und Ausmaß – durch das Gewebe selbst wieder „regeneriert“ werden können, d.h. reversibel sind. Die Reparatur *in vivo* ist ein biphasischer Prozess, bei dem zunächst über 5-6 h keine Epithelzellmigration auftritt (latente Phase) und danach das bloße Stroma von den noch vorhandenen, in Migration befindlichen Epithelzellen bedeckt wird. Die Zellproliferation wird nachfolgend initiiert, und die normalen 4-6 Zellschichten des Epithels werden wiederhergestellt [38].



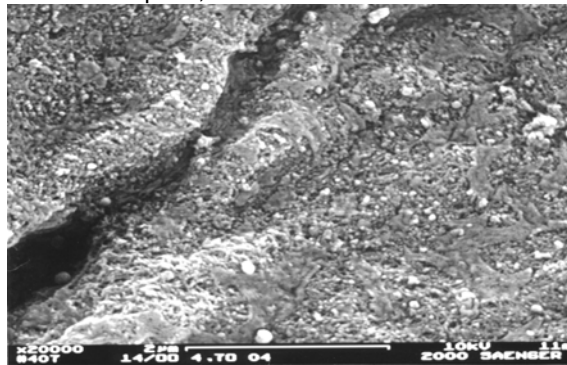
1,85%  $\alpha$ -CD



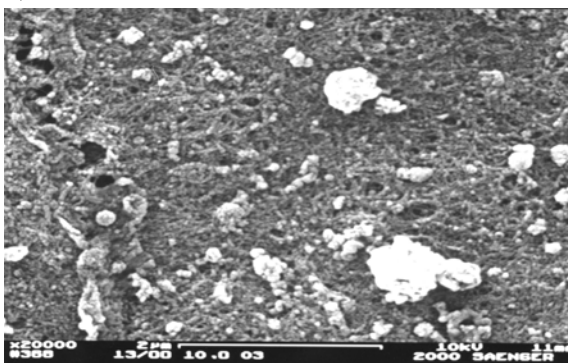
GBR-Puffer pH 7,4



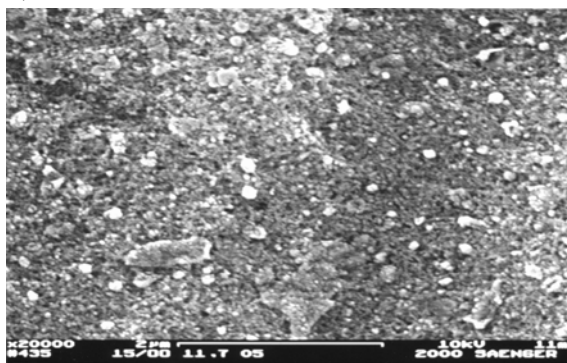
3,7%  $\alpha$ -CD



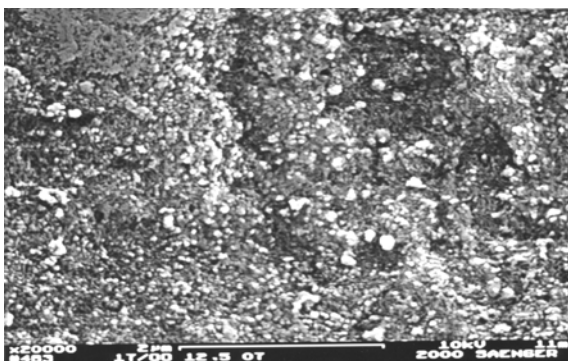
4,7% HP- $\alpha$ -CD



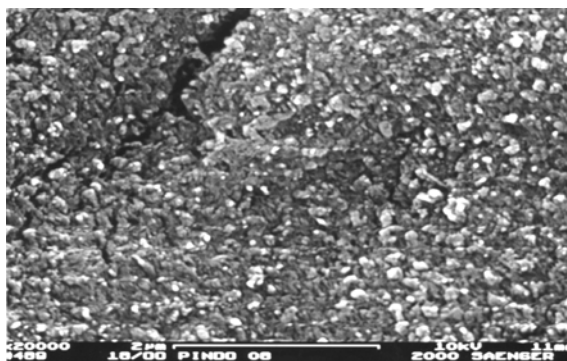
10%  $\alpha$ -CD



11,7% HP- $\alpha$ -CD



12,5% HP- $\beta$ -CD



Pindoptan®

**Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des cornealen Schweineepitheliums<sup>E</sup>, Vergrößerung x20000**



#### V.1.4. Kapitelzusammenfassung

- Die  $P_{\text{eff}}$  bzw.  $Q_{300}$ -Werte von Betaxolol, Metoprolol, Mepindolol lagen in der gleichen Größenordnung ( $P_{\text{eff}} = 2,5 \text{ bis } 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ). Die entsprechenden Daten für Alprenolol und Oxprenolol ergaben signifikant niedrigere  $P_{\text{eff}}$ , verglichen mit den zuvor erwähnten Betarezeptorenblockern, obwohl dies hinsichtlich der  $V_K$  nicht zu erwarten war. Auffallend war bei den letzteren eine 120minütige „lag time“.
- Ein Zusatz von  $\alpha$ -CD (3,7 bzw. 10%  $\alpha$ -CD) zur gepufferten MEP-Lösung (0,5% – bezogen auf die Base) führte zur signifikanten Erhöhung des  $P_{\text{eff}}$  gegenüber der CDfreien Referenz. Im Gegensatz dazu veränderte HP- $\alpha$ -CD in abgestufter Konzentration die  $P_{\text{eff}}$  nur unwesentlich.
- Eine Vorbehandlung der Schweinecornea<sup>E</sup> mit  $\alpha$ -CD (10%) führte zu einer Erhöhung der  $P_{\text{eff}}$  von MEP, was die Vermutung von CD-verursachten Veränderungen im cornealen Epithel nahe legte.
- Die Permeation von  $\alpha$ -CD (10%) selbst durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> zeigte eine zeitabhängige Zunahme des permeierten Anteils. Allerdings lag die kumulativ freigesetzte Menge nach 300 min insgesamt lediglich bei 0,36%.
- Die Permeation von MEP (0,5% – bezogen auf die Base) bzw. P (2%) aus mit hydroxypropyliertem  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -CD formulierter Lösung ergab bei Schweinecornea unterschiedlicher Herkunft differierende Ergebnisse. Unter Verwendung von Schweinecornea<sup>T</sup> (besonders schonende Behandlung der Schlachttiere) resultierte für MEP etwa der doppelte Wert (signifikanter Unterschied) gegenüber Schweinecornea<sup>E</sup> (Schlachttiere gebrüht, vgl. Material und Methoden); für P der 1,3fache Wert.
- Ein Zusatz von 12,5% HP- $\gamma$ -CD zu 0,5% (bezogen auf die Base) MEP führte an beiden Membranen zur Abnahme des  $P_{\text{eff}}$  auf etwa die Hälfte, was eine Einschlussverbindung und folglich verzögerte Arzneistofffreisetzung vermuten lässt. Die entsprechenden Versuche mit HP- $\beta$ -CD zeigten an Schweinecornea<sup>E</sup> eine Permeationszunahme für MEP um den Faktor 1,73 (lag time: 90 min). Bei Verwendung von Schweinecornea<sup>T</sup> erfolgte dagegen eine nichtsignifikante Abnahme des  $P_{\text{eff}}$  um etwa die Hälfte.
- HP- $\alpha/\beta/\gamma$ -CD änderte die Permeationsparameter ( $P_{\text{eff}}$  und  $Q_{300}$ ) von P nicht signifikant

(Schweinecornea<sup>E</sup>). In Kombination mit MEP ergab sich allerdings eine signifikante Abnahme in Gegenwart von HP- $\beta$ - bzw. HP- $\gamma$ -CD. Auch für MEP konnte ein analoger Effekt in den Kombinationspräparaten erfasst werden.

- Der Vergleich der  $Q_{300}$ -Werte von MEP und P aus der Kombination demonstrierte generell eine signifikante Abnahme in Anwesenheit von HP- $\alpha/\beta/\gamma$ -CD in Gegenüberstellung zur CD-freien Kombination. Diese Ergebnisse lassen sowohl auf Arzneistoff-Arzneistoff- als auch auf Arzneistoff-CD-Interaktionen schließen, die allerdings mit den angewandten Methoden (X-RD und FTIR) nicht verifiziert werden konnten.
- Die vergleichende Permeation von PIN, das mit HP- $\beta/\gamma$ -CD 0,15%ig in Lösung gebracht wurde, zeigte gegenüber einem verdünnten CD-freien Fertigpräparat (Pindoptan<sup>®</sup>) lediglich eine tendenzielle Abnahme.
- Löslichkeitsstudien mit PIN in GBR (pH = 7,4) brachten dessen höchste Sättigungslöslichkeit für HP- $\beta$ -CD (10%) nach Autoklavieren gegenüber Wasser als Lösungsmittel.

## V.2. Mycophenolatmofetil (MMF) und Mycophenolsäure (MPA)

Die *In-vitro*-Permeabilität von Mycophenolatmofetil (MMF) durch isolierte Schweinecornea wurde in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe untersucht [203]. Sie wurde mit einer 1%igen MMF-Lösung, die 10% HP- $\beta$ -CD enthielt, durchgeführt. GBR pH 7,4 diente hierfür als Lösungsmittel in Donator- und Akzeptorkompartiment. Um eine klare Lösung zu erhalten, war ein Autoklavierungsprozess unter Standardbedingungen (121°C, 200 kPa, 15 min) erforderlich. Dabei erfolgte jedoch eine partielle Esterhydrolyse des Prodrugs MMF. Die HPLC-Analytik ergab 56% MPA; dementsprechend verblieben 44% der Ausgangsverbindung MMF [203]. Tabelle 23 gibt einige Parameter der Ausgangslösung bzw. -komponenten wieder.

**Tabelle 23: Physikalische Kenngrößen einer MMF/HP- $\beta$ -CD-Lösung; nach [202]**

1% MMF	Medium	Viskosität $\eta$ [mPas]	Osmolalität [mOsmol/kg]	RI	Dichte $\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	OS $\sigma$ [mN/m]	pH
sine CD	GBR	0,825	364	1,331	1,001	58,45	7,32
10% HP- $\beta$ -CD	GBR	0,990	410	1,348	1,035	55,13	7,28

RI: Brechungsindex; OS: Oberflächenspannung

Der bestimmte Verteilungskoeffizient (n-Octanol/GBR pH 7,4) für MMF betrug 23,41; derjenige für MPA 3,73. Der Verteilungskoeffizient (n-Octanol/HP- $\beta$ -CDhaltige Testlösung) wurde für MMF mit 12,25 und für MPA zu 0,46 ermittelt, d.h. durch CD wird die Hydrophobie sowohl des Esterprodrugs als auch der freien Säure deutlich gesenkt [203].

Aus den Permeationsstudien der Vorläuferarbeit [203] ergab sich, dass MMF in drei von zehn Zellen im Akzeptormedium nicht detektierbar war; in sieben Zellen betrug die Permeationsrate (Schweinecornea<sup>E</sup>) nach 300 min für MMF lediglich 0,23% (0,38  $\mu$ g/ml). Ein  $P_{\text{eff}}$  für MMF wurde nicht berechnet, da messbare Konzentrationen von MMF teilweise zeitlich stark verzögert ( $t > 210$  min) zu erfassen waren. Hingegen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen permeierter MPA-Konzentration und der Versuchsdauer beschrieben werden. Der  $P_{\text{eff}}$  betrug  $2,81 \pm 1,03 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Die Permeationsrate war ebenfalls niedrig. Nach 300 min gelangten lediglich  $1,00 \pm 0,38\%$  ( $2,42 \pm 0,97$   $\mu$ g/ml) der Ausgangskonzentration an MPA in das Akzeptorkompartiment.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die metabolische Aktivität des isolierten Gewebes erhalten blieb und das im Donator vorliegende Prodrug bei der Membranpassage nahezu vollständig enzymatisch gespalten wurde.

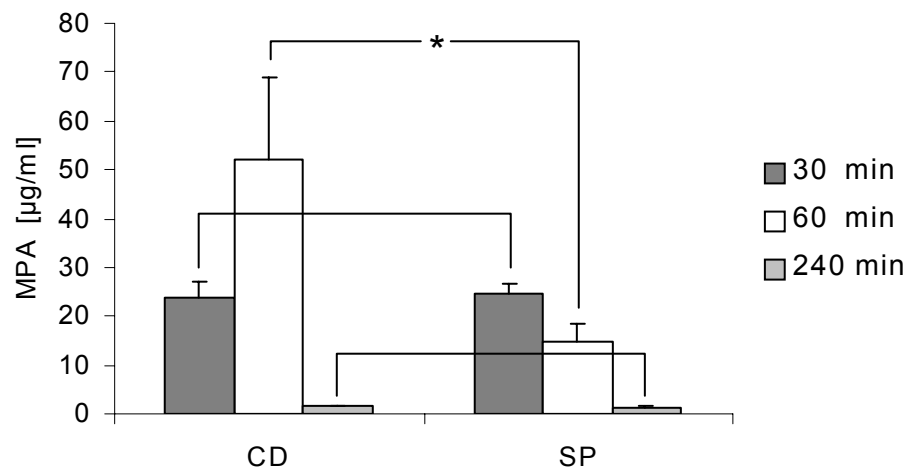
In der folgenden Studie sollten die okulare Verträglichkeit sowie die intraokulare Verfügbarkeit und Verteilung von MMF aus einer Mycophenolatmofetil-Lösung (MMF/CD; Ausgangskonzentration: 1% MMF, 10% HP- $\beta$ -CD) sowie aus einer 1%igen MMF-Suspension (MMF/SP) am Kaninchen untersucht werden. Im Gegensatz zu den Experimenten *in vitro* mit GBR pH 7,4 wurden die MMF-Lösungen bzw. -Suspensionen in Phosphatpuffer nach Sørensen (SPP) pH 7,4 (s. Material und Methoden, VI.2.4.4.1) hergestellt, um einer realistischen Augentropfen-formulierung eher zu entsprechen. Die Hydrolyse von MMF zu MPA nach dem Autoklavierungsprozess erfolgte analog zum GBR-Medium (Material und Methoden, VI.2.6.1). Darüber hinaus wurde zum Vergleich das okulare Verteilungsverhalten einer entsprechenden MPA-Lösung (MPA/CD: 1% MPA, 10% HP- $\beta$ -CD) analysiert.

### *V.2.1. Intraokulare MMF / MPA-Verteilung*

Nach Applikation von jeweils 5 x 50  $\mu$ l (Material und Methoden, VI.2.6) einer 1%igen MMF/CD-Lösung bzw. -Suspension (Material und Methoden, VI.2.6.1) an jeweils vier Kaninchen wurden nach 30, 60 bzw. 240 min die Tiere getötet und anschließend die zu untersuchenden Flüssigkeiten und Gewebe entnommen (Material und Methoden, VI.2.6.3). Die Konzentrationen an MMF und MPA wurden in den Flüssigkeiten Kammerwasser (KW), Glaskörper (GK) und Plasma (P) sowie in den festen Geweben Cornea (CR), Sclera (SC), Conjunctiva (CJ) und Iris-Ziliarkörper (IZ) bestimmt. Nach Aufarbeitung und analytischer Auswertung war nach MMF/CD-Applikation lediglich die aktive Wirksubstanz MPA nachzuweisen (Abb. 26 - Abb. 29), nicht mehr das Prodrug MMF. Äußerst geringe Konzentrationen an MMF ließen sich dagegen nach Applikation von MMF/SP in den okularen Geweben detektieren (Abb. 30).

Abb. 26 präsentiert die *Kammerwasser*-Spiegel zu den drei Versuchszeiten 30, 60 und 240 min. Nach 30 min konnten sowohl für MMF/CD als auch für MMF/SP etwa gleiche, relativ hohe Wirkstoffkonzentrationen im Kammerwasser nachgewiesen werden ( $23,98 \pm 3,16$  bzw.  $24,49 \pm 2,14$   $\mu$ g/ml). Nach Applikation von MMF/CD war die MPA-Konzentration dagegen

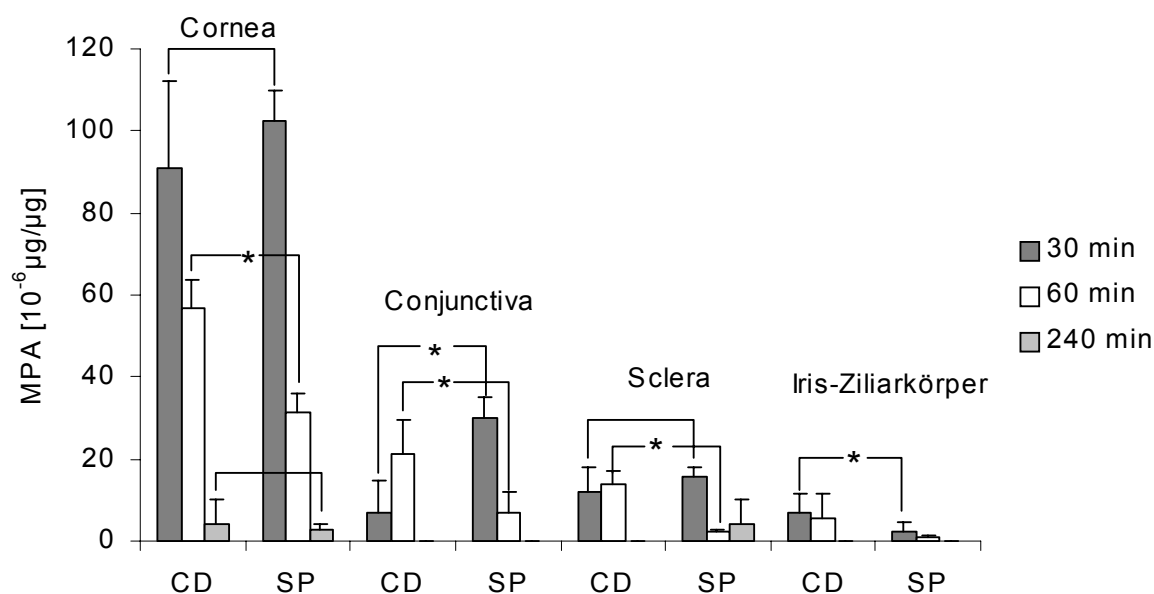
nach 60 min im Vergleich zu MMF/SP signifikant auf das 4,3fache erhöht ( $52,20 \pm 16,81$  gegenüber  $14,71 \pm 3,92 \mu\text{g/ml}$ ). Sowohl nach Verabreichung der CD-Lösung als auch der Suspension war MPA noch nach 240 min analytisch zu erfassen, wenn auch in sehr niedrigen Konzentrationen ( $1,59 \pm 0,18$  bzw.  $1,08 \pm 0,63 \mu\text{g/ml}$ ).



**Abb. 26: MPA-Spiegel im Kammerwasser des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4); \*signifikanter Unterschied zwischen MMF/CD und MMF/SP für  $p < 0,05$  (t-Test und Single-Factor-ANOVA)**

Wie aus Abb. 27 hervorgeht, fand sich auch in *Cornea*, *Sclera* und *Conjunctiva* nach 60 min ein durch MMF/CD signifikant erhöhter MPA-Spiegel im Vergleich zu MMF/SP. Im Gegensatz dazu war der MPA-Spiegel in der *Conjunctiva* nach 30 min signifikant niedriger für MMF/CD ( $6,75 \pm 7,84 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), verglichen mit MMF/SP ( $30,15 \pm 4,89 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ).

Berechnet man die Gesamtkonzentration für die jeweilige Formulierung zum Zeitpunkt 30 bzw. 60 min, indem man die durchschnittlichen Einzelwerte für *Cornea*, *Conjunctiva*, *Sclera* und *Iris-Ziliarkörper* addiert, ergibt sich folgendes: Nach 30 min wird für MMF/SP eine höhere Gesamtkonzentration erreicht (1,29fach höher als MMF/CD). Nach 60 min hingegen, ist die Gesamtkonzentration an MPA für MMF/CD 2,36fach höher verglichen mit MMF/SP.

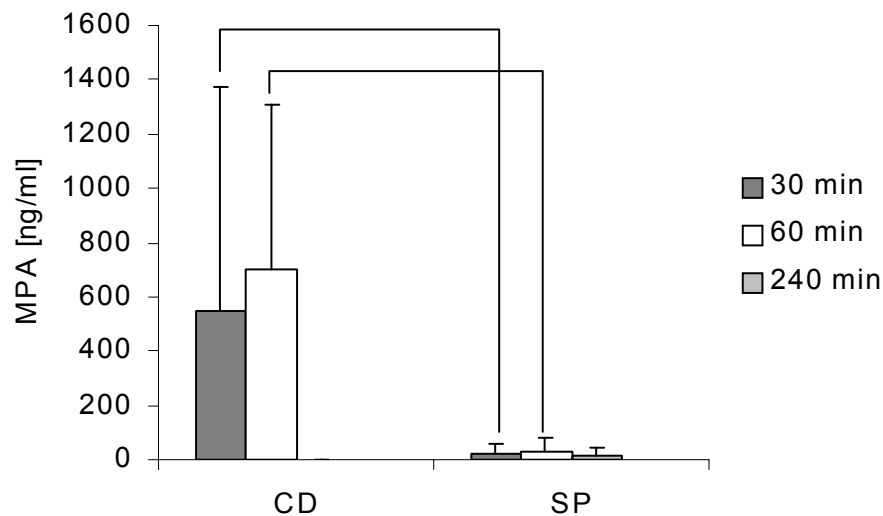


**Abb. 27: MPA-Gewebespiegel im Kaninchenauge nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4); \*signifikanter Unterschied zwischen MMF/CD und MMF/SP für  $p < 0,05$  (t-Test und Single-Factor-ANOVA)**

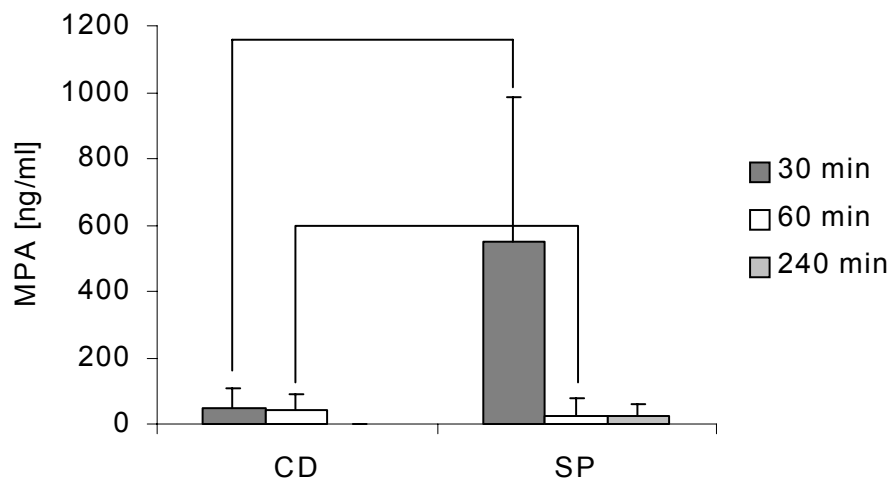
Darüber hinaus wurden die unterschiedlichen galenischen Zubereitungen (MMF/CD, MMF/SP) durch einen zweifaktoriellen (Two factor-) ANOVA-Test (Material und Methoden, VI.2.9.1) statistisch geprüft. Hierbei wurden die einzelnen Zeitpunkte („time effect“) sowie die Formulierungen MMF/CD und MMF/SP („type effect“) untereinander verglichen.

Nach diesen Berechnungen waren die Werte zu den einzelnen Zeitpunkten, zu denen die Gewebekonzentrationen bestimmt wurden, für  $p < 0,05$  signifikant verschieden, ebenso die Unterschiede zwischen den Formulierungen MMF/CD und MMF/SP.

Die ermittelten Konzentrationen von MPA im *Glaskörper* (Abb. 28) waren im Vergleich zum Kammerwasser (Abb. 26) extrem niedrig ( $549,27 \pm 822,55$  ng/ml für MMF/CD bzw.  $19,13 \pm 38,25$  ng/ml für MMF/SP nach 30 min) und liegen damit jedoch nur tendenziell für MMF/CD etwas höher. Dieser nichtsignifikante Unterschied besitzt auch keine therapeutische Relevanz. Die *Plasmaspiegel* wurden in der gleichen, niedrigen Konzentration, nämlich in Nanogramm-Mengen ( $46,79 \pm 62,19$  ng/ml für MMF/CD bzw.  $547,36 \pm 440,31$  ng/ml für MMF/SP), bestimmt, wobei die Tendenz hier umgekehrt liegt, indem MMF/SP die etwas höheren Werte erbrachte. Dieser Befund ist als sehr wertvoll zu betrachten, insofern als mögliche systemischen Nebenwirkungen durch Anwendung von MMF/CD minimiert sein müssten.

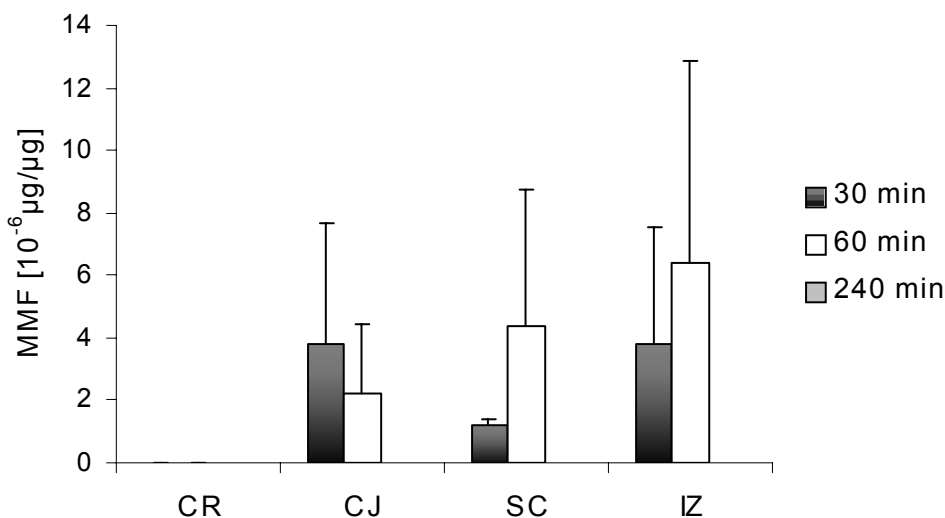


**Abb. 28: MPA-Spiegel im Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4)**



**Abb. 29: MPA-Spiegel im Plasma des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4)**

Hinsichtlich der nachgewiesenen „Restmengen“ an ungespaltenem MMF in den Geweben (Abb. 30) ist es bemerkenswert, dass MMF weder für die CD-haltige Lösung noch für die Suspension in der Cornea gefunden wurde. Das Prodrug MMF war lediglich in Conjunctiva, Sclera und Iris-Ziliarkörper nach Anwendung von MMF/SP zu erfassen. Die MMF-Spiegel blieben insgesamt niedrig und fallen durch hohe Fehler auf (Abb. 30). Verglichen mit den korrespondierenden MPA-Spiegeln betragen sie ca. 10% (Abb. 27).



**Abb. 30: MMF-Gewebespiegel im Kaninchenauge nach Applikation von MMF/SP:** Cornea (CR), Conjunctiva (CJ), Sclera (SC) und Iris-Ziliarkörper (IZ); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4)

### V.2.2. Vergleichende MMF- und MPA-Applikation

Tabelle 24 stellt die Konzentrationen an MPA, die nach Applikation von MMF/CD und MPA/CD nach 30 und 60 min erreicht wurden, vergleichend gegenüber. Obwohl die MMF/CD-Formulierung nur noch ungefähr 50% intaktes MMF und demzufolge ungefähr 50% MPA enthielt (Material und Methoden, VI.2.6.1), lagen die erzielten MPA-Spiegel überwiegend höher als diejenigen, die aus der direkten MPA/CD-Applikation resultierten. Lediglich die Plasmaspiegel und der 30 min-Wert der Conjunctiva zeigten eine Tendenz zu höheren Werten durch MPA/CD. Ersteres begünstigt wiederum MMF/CD im Hinblick auf Verminderung potentieller systemischer Nebenwirkungen. Letzteres spricht für eine Präferenz des nicht-cornealen/conjunktivalen Absorptionsweges der freien Säure und weist auf ein verzögertes Anfluten von MPA aus dem Prodrug hin, das zunächst esteratisch gespalten werden muss. Hinsichtlich der Plasmawerte und der zu erwartenden systemischen Effekte wäre demnach die MMF/CD-Formulierung zu bevorzugen. Jedoch reicht die Anzahl von nur vier Versuchstieren, wie auch die hohen Standardabweichungen erkennen lassen, nicht aus, um eindeutige Aussagen zu treffen.



**Tabelle 24: MPA-Spiegel (30 und 60 min) im Kaninchenauge nach Applikation von MPA/CD bzw. MMF/CD**

Flüssigkeit/ Gewebe	Dimension	MPA/CD		MMF/CD	
		30 min	60 min	30 min	60 min
KW	[µg/ml]	6,4 ± 2,3	5,1 ± 2,9	24,0 ± 3,2	52,2 ± 16,8
GK	[ng/ml]	72 ± 38	42 ± 58	549 ± 823	689 ± 608
P	[ng/ml]	931 ± 93	126 ± 224	47 ± 62	40 ± 47
CR	[10 <sup>-6</sup> µg/µg]	25,4 ± 14,6	16,3 ± 4,9	90,8 ± 21,2	56,9 ± 6,9
SC	[10 <sup>-6</sup> µg/µg]	7,7 ± (1)	2,0 ± 0,8	11,9 ± 5,9	14,1 ± 2,9
CJ	[10 <sup>-6</sup> µg/µg]	16,4 ± 17,8	1,5 ± 2,5	6,8 ± 7,8	21,1 ± 8,3
IZ	[10 <sup>-6</sup> µg/µg]	0,03 ± 0,07	0,06 ± 0,12	6,8 ± 4,7	5,4 ± 6,0

KW: Kammerwasser, GK: Glaskörper, P: Plasma, CR: Cornea, SC: Sclera, CJ: Conjunctiva, IZ: Iris-Ziliarkörper; Mittelwert ± SD (n = 4) außer (1) n = 2

### V.2.3. Mitreaktion des unbehandelten Auges

Die Applikation von MMF/CD, MMF/SP und MPA/CD erfolgte ausschließlich in den Bindehautsack des rechten Auges. Das linke Auge blieb unbehandelt (Referenzauge), wurde aber analog zum rechten Auge aufgearbeitet (s. Material und Methoden, VI.2.6.3). Das Prodrug MMF konnte in keinem Fall in den Geweben des Referenzauges detektiert werden. Auch MPA wurde in Conjunctiva, Iris-Ziliarkörper und Glaskörper zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. Dagegen wurden wider Erwarten nach Applikation aller drei Formulierungen geringe Mengen an MPA im Kammerwasser quantifiziert. Nach Verabreichung von MMF/SP wurde zum Zeitpunkt 240 min MPA in der Cornea der vier unbehandelten Augen erfasst. In der Sclera konnte nach Applikation von MMF/CD nach 60 min in einem Auge eine Minimalkonzentration detektiert werden (Tabelle 25).

Auffallend an diesen Auswertungen ist, dass nach Applikation der MMF-Suspension schon nach 30 min in allen vier Augen nachweisbare MPA-Konzentrationen vorhanden und nach 60 min sogar noch weiter erhöht waren (Tabelle 25). Nach 240 min war im Kammerwasser kein MPA mehr detektierbar, wohl aber in der Cornea (Tabelle 25).

**Tabelle 25: MPA-Konzentrationen nach Applikation von MMF/CD, MMF/SP und MPA/CD im Referenzauge (links)**

MMF/CD	KW [ $\mu\text{g/ml}$ ]	% <sup>1</sup>	SC [ $10^{-6}\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	% <sup>1</sup>	CR [ $10^{-6}\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	% <sup>1</sup>
30 min	0,135/ 0,118/ -/ - (0,063 $\pm$ 0,073)	0,26	-		-	
60 min	-		0,143/ -/ -/ - (0,036 $\pm$ 0,072)	0,3	-	
240 min	-/ -/ 0,904/ - (0,226 $\pm$ 0,452)	14,2	-		-	
<b>MMF/SP</b>						
30 min	0,088/ 0,100/ 0,242/ 0,130 (0,140 $\pm$ 0,070)	0,57	-		-	
60 min	0,509/ 0,354/ 0,185/ 0,210 (0,315 $\pm$ 0,150)	0,60	-		-	
240 min	-		-		0,187/ 0,459/ 0,418/ 0,492 (0,389 $\pm$ 0,138)	15,0
<b>MPA/CD</b>						
30 min	0,0370/ -/ -/ - (0,009 $\pm$ 0,019)	0,14	-		-	
60 min	-		-		-	

KW: Kammerwasser; SC: Sclera; CR: Cornea; n = 4; (-): nicht nachweisbar (Bestimmungsgrenze: 0,04  $\mu\text{g/ml}$ );  
<sup>1</sup>bezogen auf das rechte, mit Augentropfen (MMF/CD, MMF/SP bzw. MPA/CD) behandelte Auge

Die Fehler der für MMF/CD und für MPA/CD nachgewiesenen MPA-Konzentrationen sind sehr hoch (115-211%), da in der Mehrzahl der Augen kein MPA detektierbar war. Im Gegensatz dazu sind die Fehler für MMF/SP niedrig (35-50%). Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, dass hier – wenn MPA nachgewiesen wurde – MPA in allen vier Augen gefunden wurde.

Das im Kammerwasser des Referenzauges gefundene MPA nach Applikation von MMF/CD beträgt nach 30 min durchschnittlich 0,26% der Konzentration des rechten, behandelten Auges. Hierbei muss angemerkt werden, dass MPA nur in zwei von vier Augen zu erfassen war. Weiterhin wurde nach 240 min nur ein Einzelwert für das Kammerwasser bestimmt, genauso wie nach 60 min für die Sclera.

Aussagekräftiger erscheinen die für MMF/SP bestimmten Werte. Nach 30 min konnten 0,57%, nach 60 min 0,30% im Kammerwasser des ReferenzAuges nachgewiesen werden (verglichen mit dem rechten, mit MMF/SP behandelten Auge). Auffallend ist außerdem die MPA-Konzentration nach 240 min in der Cornea, die sogar 15% verglichen mit dem rechten Auge darstellt. Diese Daten sind vergleichbar mit den für MMF/SP gefundenen deutlich höheren Plasmaspiegeln verglichen mit MMF/CD.

Insbesondere die Daten für MMF/SP verdeutlichen, dass eine Mitreaktion des unbehandelten Auges zumindest mit in Erwägung gezogen werden sollte. Man kann davon ausgehen, dass MPA die Blut-Kammerwasserschranke (Theoretische Grundlagen, III.1.3) teilweise passieren kann und ein Teil der vom rechten Auge ins Serum gelangten Substanz dann im linken, unbehandelten Auge detektierbar wird. Auch in der Literatur werden solche Effekte beschrieben, z.B. geben systematische Studien nach systemischer Verabreichung von CsA Hinweise auf die Wiederfindung im Kammerwasser [157].

#### V.2.4. *Resümee*

Nach topischer Anwendung von Arzneistoffen in der Ophthalmologie gibt es zwei dominante Wege für den Arzneistofftransport ins Auge (Theoretische Grundlagen, III.2.1). Auf dem Hauptweg, den viele lipophile Arzneistoffe bevorzugen, wandert das Molekül aus dem präcornealen Gebiet via Cornea ins Kammerwasser und weiter zu den intraokularen Geweben. Der zweite Weg nach präcornealer Applikation geht über Conjunctiva und Sclera zu den intraokularen Geweben. Die nicht- oder para-corneale Absorption über die Conjunctiva steht bevorzugt großen und überwiegend hydrophilen Arzneistoffmolekülen zur Verfügung [204]. Neben dem polaren bzw. apolaren Charakter (z.B. charakterisiert durch den Verteilungskoeffizienten) eines Arzneistoffs [201] nehmen weitere Stoffeigenschaften Einfluss auf die *In-vivo*-Verteilung.

Sowohl MMF/CD als auch MMF/SP führten in den vorliegenden Verteilungsstudien am Kaninchenauge bereits nach 30 min zu relativ hohen Konzentrationen an MPA, dem aktiven Teil (Elternverbindung) des Prodrugs MMF, in Cornea und Kammerwasser. Dieses Ergebnis lässt auf bevorzugte Affinität des lipophilen MMF zum lipophilen cornealen Epithel schließen, in dem das Prodrug rasch durch Esterasen gespalten wird. Für

Hornhauttransplantationen, nach denen hohe Konzentrationen an MPA in Cornea und Kammerwasser angestrebt werden, könnte dieser Effekt von Bedeutung sein.

Es fällt auf, dass nach MMF-Applikation nur der aktive Metabolit MPA in Cornea und Kammerwasser nachzuweisen war. Dieser Befund entspricht den von BABIOLE et al. [11] berichteten Ergebnissen zur cornealen Permeabilität von Unoprostonisopropyl, das ebenfalls ein Esterprodrug darstellt. Diese Studie beschäftigte sich mit der cornealen Permeation des Prostaglandin-Prodrugs und seines Metaboliten, der eigentlichen Wirkkomponente, durch isolierte Schweinecornea *in vitro*. Im Fokus der zitierten Arbeit stand die enzymatische Arzneistoffhydrolyse im cornealen Epithel von Schweineaugen. Darüber hinaus wurde der Arzneistoffmetabolismus an isolierten Gewebekomponenten untersucht. Auch in dieser Studie ließ sich nach *In-vitro*-Permeation durch intakte Schweinecornea (mit Epithel) lediglich der Metabolit (d.h. die freie Säure) im Akzeptorkompartiment detektieren. Der lipophile Ester Unoprostonisopropyl war so gut wie nicht in der Lage, die Cornea ohne Epithel, d.h. primär das Stroma, zu permeieren. Wurde dagegen die entsprechende freie Säure im Donatorkompartiment vorgelegt, verhielt sich die corneale Permeabilität genau umgekehrt: die freie Säure permeierte kaum die intakte Cornea. Wurde jedoch das Epithel entfernt, resultierte ein stromaler  $P_{\text{eff}}$  in der gleichen Größenordnung wie zuvor für das Prodrug nach Passage der intakten Cornea. BABIOLE et al. [11] wiesen die Hauptesteraseaktivität im cornealen Epithel nach. Offensichtlich ist die Esterhydrolyse im Epithel zum hydrophileren Metaboliten Voraussetzung für die weitere Permeation der wirksamen Elternverbindung durch Stroma und Endothel bis zum Kammerwasser. Auch andere Autoren berichten von einer hohen Esteraseaktivität im cornealen Epithel [37, 110, 111]. Die Esteraseaktivität weist speziesspezifische Unterschiede auf. Rinderaugen zeigen gegenüber Kaninchen eine höhere Esteraseaktivität im Stroma [111], während beim Kaninchen erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Esterasensubgruppen zwischen pigmentierten und Albino-Kaninchen gefunden wurden [110].

Weiterhin muss in der vorliegenden Studie mit in Betracht gezogen werden, dass CDe möglicherweise esteratische Vorgänge katalysieren [219].

Wie die gefundene Arzneistoffverteilung in den Geweben nach Applikation der Suspension (MMF/SP) verdeutlicht (Abb. 30), wird von MMF partiell auch der nicht-/para-corneale Weg über Conjunctiva, Sclera und Iris-Ziliarkörper zurückgelegt. Allerdings konnten nur sehr

niedrige Gewebekonzentrationen mit extrem hohen Fehlerschwankungen nachgewiesen werden (z.B. nach 30 min: CJ:  $3,77 \pm 3,87$ ; SC:  $1,18 \pm 3,87$ ; IZ:  $3,77 \pm 3,77 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{g}$  und ähnlich nach 60 min) (Abb. 30). Diese okularen Gewebe sind weniger lipophil als das corneale Epithel und verfügen deshalb über eine weitaus geringere Affinität zum lipophilen Prodrug MMF. Außerdem ist die Esteraseaktivität in der Conjunctiva geringer, was ebenfalls zur Erklärung des nachgewiesenen Prodrugs in Conjunctiva, Sclera und Iris-Ziliarkörper nach partikulärer MMF-Applikation in Form der Suspension herangezogen werden kann.

Wurde direkt die freie Mycophenolsäure als CDhaltige Formulierung (MPA/CD) appliziert, resultierte eine weit geringere Penetrationsrate für MPA als nach Gabe der Prodrug-Lösung (MMF/CD; ca. 50% MPA enthaltend). Es wurden lediglich 25% der Kammerwasserkonzentration nach 30 min und 10% nach 60 min erreicht (vgl. Gegenüberstellung Tabelle 24). Dieses Ergebnis entspricht dem Prodrug-Konzept [93, 112, 231], bei dem das lipophilere Prodrug die entscheidende, biologische Barriere überwindet und dann an seinem Zielort in seine aktive(n) Komponente(n) gespalten wird.

Weiterhin veranlassten die vorliegenden Daten zur Diskussion über den transcornealen sowie den para-cornealen Penetrationsweg lokal applizierter Pharmaka am Auge allgemein [19]. MMF wurde in diesem Zusammenhang lediglich als Modellsubstanz betrachtet.

Über die Anteile der beiden Penetrationswege liegen nur wenige Untersuchungen vor. Der trans-corneale Weg kann beispielsweise durch Versiegelung der cornealen Oberfläche mit einer aufgeklebten Kontaktlinse blockiert werden [4]. Bei derartigen experimentellen Ansätzen können allerdings erhebliche Artefakte entstehen, da davon auszugehen ist, dass die Blockade eines Transportwegs gleichzeitig zur Erhöhung des über den anderen Weg penetrierten Substanzanteils führt [19]. Günstiger erscheinen dagegen Untersuchungen, die auf dem Einsatz von Substanzen (wie z.B. MMF) beruhen, die bei transcornealer bzw. para-cornealer Penetration quantitativ unterschiedlich metabolisiert werden. Der Anteil der jeweils penetrierten bzw. permeierten Substanz kann dann durch Messung der entsprechenden Metaboliten bestimmt werden. Eine ausführliche Diskussion zu diesem Thema lässt sich bei BERTELMANN et al. [19] nachlesen.

Nach subjektiver, makroskopischer Beurteilung wurde die MMF/CD-Lösung von allen Kaninchen gut vertragen. Im Gegensatz dazu war bei den mit der MMF/SP-Suspension behandelten Tieren eine leichte Hyperämie zu beobachten. Die gute okuläre Verträglichkeit

von HP- $\beta$ -CD [61, 107, 129], die bereits zur Auswahl dieses CD-Derivats bewogen hatte, konnte somit auch in den vorliegenden Studien bestätigt werden.

HP- $\beta$ -CD ist, wie auch andere CDe, in der Lage, lipophile Arzneistoffe in Lösung zu bringen, ohne deren lipophilen Charakter zu ändern [63]. Die gefundene Zunahme der Arzneistoffverfügbarkeit in Anwesenheit von HP- $\beta$ -CD ist auf eine schnelle Dissoziation des Arzneistoff/CD-Komplexes zugunsten des freien Arzneistoffmoleküls vor dem Epithel zurückzuführen. Weiterhin lässt diese Studie, wenn man die MPA-Konzentrationen nach Applikation von MMF/CD im Kammerwasser (Abb. 26) nach 60 min betrachtet, einen die Wirkungsdauer verlängernden, retardierenden Arzneistofffreisetzungsprozess vermuten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die MMF/CD-Formulierung (und mit Einschränkung auch MPA/CD) zu therapeutisch relevanten Wirkstoffkonzentrationen im Kaninchenauge (Cornea, Kammerwasser) führen. Die im Glaskörper erzielten Konzentrationen für MMF/CD, MMF/SP und MPA/CD sind hingegen an der Grenze der biologischen Wirksamkeit von MPA *in vitro* (Proliferationshemmung von Lymphozyten in der Zellkultur) [6]. Aufgrund der erheblich niedrigeren MPA-Konzentrationen im hinteren Augenabschnitt (s. Abb. 28, Tabelle 24), ist eine Wirksamkeit des topisch applizierten MMF bei der intermediären und der posterioren Uveitis eher nicht zu erwarten. Für immunmedierte Erkrankungen der okulären Oberfläche und des vorderen Segments könnte die topische Therapie mit MMF dagegen einen vielversprechenden Ansatz darstellen [19]. Dieser Befund ist außerdem von Bedeutung in Hinblick auf Anwendung nach Keratoplastik (s. Theoretische Grundlagen, III.2.3).

Noch unveröffentlichte Daten aus der Kooperation mit den klinischen Ophthalmologen [166] demonstrieren die potentielle Eignung von MMF/CD zur topischen Anwendung bei endotoxininduzierter Uveitis. Als Versuchstiere wurden Lewis-Ratten verwendet. Bereits acht Stunden nach Induktion (intraperitoneale Injektion von *Salmonella Typhimurium*) der Uveitis zeigte die Behandlung mit MMF/CD eine Tendenz, die zelluläre Entzündungsreaktion in der vorderen Augenkammer im Vergleich zur Kontrollgruppe zu hemmen. Allerdings erwies sich die MMF/CD-Gruppe in Bezug auf den entzündungshemmenden Effekt gegenüber einem Fertigpräparat, das 1% Prednisolon enthielt, als unterlegen [166].

### *V.2.5. Kapitelzusammenfassung*

- Die intraokulare Wirkstoffverteilung in Kammerwasser, Cornea, Sclera, Conjunctiva und Iris-Ziliarkörper nach Applikation von MMF/CD, MMF/SP bzw. MPA/CD wurde nach 30, 60 und 240 min bestimmt. Zusätzlich wurden die Plasmaspiegel ermittelt.
- Es konnte nach topischer Anwendung von MMF/CD lediglich die aktive Wirksubstanz MPA nachgewiesen werden. Ausschließlich nach Applikation von MMF/SP waren Minimalkonzentrationen an MMF in Conjunctiva, Sclera und Iris-Ziliarkörper detektierbar.
- In der Cornea konnte MMF in keinem Fall gefunden werden, was auf eine hohe Esteraseaktivität im cornealen Epithel zurückzuführen ist (esteratische Spaltung von MMF zu MPA). Letztere ist in Conjunctiva, Iris-Ziliarkörper und Sclera deutlich niedriger.
- Nach Applikation von MMF/CD waren die MPA-Kammerwasserspiegel nach 60 min, verglichen mit MMF/SP, 4,3fach (signifikant) höher.
- Auch in Cornea, Sclera und Conjunctiva fanden sich nach 60 min durch MMF/CD (signifikant) erhöhte MPA-Spiegel im Vergleich zu MMF/SP. Ein signifikant niedrigerer MPA-Spiegel resultierte dagegen in der Conjunctiva nach 30 min.
- MPA war in Minimalmengen auch im linken, unbehandelten Auge nachzuweisen, insbesondere nach Verabreichung von MMF/SP. Dieser Befund korreliert mit den höheren Plasmaspiegeln bei Anwendung von MMF/CD (verglichen mit MMF/SP).
- Obwohl die MMF/CD-Ausgangslösung nur ca. 50% MMF und folglich ca. 50% MPA enthielt, lagen die bestimmten MPA-Spiegel überwiegend höher als diejenigen, die aus der direkten MPA/CD (100% MPA)-Applikation hervorgingen.
- HP- $\beta$ -CD wurde in allen Fällen vom Kaninchenauge gut vertragen.

### V.3. Selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten

#### V.3.1. ZK 216771

##### V.3.1.1. Rezepturentwicklung

Zur Durchführung der vorgesehenen *In-vitro*- (Permeation durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>, Penetration in isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>) und *In-vivo*-Studien (topische, okulare Behandlung von Ratten nach Keratoplastik) im Hinblick auf eine spätere patientenfreundliche Anwendung war für die neue SEGRA-Verbindung ZK 216771 eine leicht applizierbare, möglichst wässrige Lösung zu entwickeln. Weiterhin sollte die Formulierung stabil und am Auge gut verträglich sein.

**Tabelle 26: Sättigungslöslichkeit (c<sub>s</sub>) von ZK 216771 in wässrigen Cyclodextrinlösungen**

Cyclodextrin	[%]	L: ZK 216771 [mg/ml]		
		W	A	E
<b>γ-CD</b>	10	0,116	-	-
	20	0,159	-	-
	30	0,251	-	-
<b>HP-γ-CD</b>	10	0,785	0,669	0,944
	20	1,327	1,086	1,044
	30	1,782	1,283	1,451
<b>HP-β-CD</b>	10	0,097		0,080
	20	0,181		0,186
	30	0,225		0,277

**W:** Wasser für Injektionszwecke pH 6,3 bei Raumtemperatur

**A:** Erhitzen im Autoklaven unter Standardbedingungen (121°C, 200 kPa, 15 min)

**E:** Zusatz von 5% Ethanol bei Raumtemperatur

Zur Löslichkeitsverbesserung der extrem schwerlöslichen Substanz ZK 216771 (Theoretische Grundlagen, III.3.4) kamen bevorzugt CDe in Betracht. Die mit 10, 20 oder 30% γ-CD, HP-γ-CD bzw. HP-β-CD erzielten Sättigungslöslichkeiten in Wasser (pH = 6,3) (Material und Methoden, VI.2.3.2.3) sind in Tabelle 26 wiedergegeben. Die Ergebnisse lassen eine CD-Konzentrationsabhängigkeit erkennen und zeigen für HP-γ-CD den besten Effekt



(Löslichkeitsverbesserung gegenüber Phosphatpuffer pH 7,4 (7,4 µg/ml) für 20/ 30% HP-γ-CD um den Faktor 179,3/ 240,9). Zusätzliches Anlösen in Ethanol (Endkonzentration 5%) oder Autoklavieren unter Standardbedingungen erbrachten dagegen keinen Vorteil (s. Tabelle 26) bzw. sogar eher Nachteile.

Um eine vermutlich therapeutisch relevante Konzentration zu erzielen, wurde eine *0,12-1%ige Konzentration von ZK 216771* angestrebt. Die in diesem Bereich liegenden Werte der HP-γ-CD-Serie sind in Tabelle 26 *kursiv* geschrieben. Die relevanten, im unteren angestrebten Konzentrationsbereich liegenden Lösungen weisen jedoch einen hohen CD-Gehalt (20/ 30% HP-γ-CD) auf und scheinen zur Anwendung als Ophthalmikum eher ungeeignet. Okulare Irritationen sind nicht auszuschließen und die Arzneistofffreisetzung könnte verzögert sein. Grundsätzlich sollte eine möglichst niedrige CD-Konzentration angestrebt werden [125].

Mit dem Ziel der Erhöhung der ZK 216771-Konzentration bei gleichzeitiger Erniedrigung der CD-Konzentration in der Formulierung wurde durch Manipulierung der Herstellung (s.v.) eine erfolgreiche Rezeptur mit nur 10% HP-γ-CD und 2% Ethanol gefunden, die 0,25% des Wirkstoffs enthielt (Tabelle 27). Außerdem enthielt die Lösung 0,04g Natriumchlorid, womit eine annähernde Isotonie erreicht wurde.

**Tabelle 27: Rezeptur wässriger Augentropfen von ZK 216771**

Substanzen	Einwaage [g]
ZK 216771	0,025
Ethanol	0,20
HP-γ-CD	1,00
Natriumchlorid	0,040
Wasser für Injektionszwecke	ad 10,0

Diese wässrigen Augentropfen wiesen einen pH-Wert von 6,3 auf und hatten nach fünfwöchiger Überprüfung (Lagerung im Kühlschrank) einen ZK 21677-Gehalt von 91,6%.

Entscheidend für das erfolgreiche Auflösen von 0,25% ZK 216771 war das Hinzufügen der gesamten HP-γ-CD-Menge in Form von Festsubstanz zur ethanolischen Wirkstofflösung unter Rühren und die nachfolgende allmähliche Zugabe des Wassers für Injektionszwecke. Es

ist ausdrücklich anzumerken, dass die Herstellung nicht erfolgreich verlief, wenn zur Lösung von ZK 216771 in Ethanol die entsprechende 10%ige wässrige HP- $\gamma$ -CD-Lösung hinzugefügt wurde.

#### V.3.1.2. In-vitro-Permeation

Es wurden in Analogie zu den unter Untersuchungen IV.3 aufgeführten allgemeinen Angaben zur Versuchsdurchführung Permeationsstudien an isolierter Schweinecornea<sup>T</sup> durchgeführt. Die Donatorkonzentration an ZK 216771 betrug 0,25%. Der pH-Wert der frisch hergestellten Lösung wurde zu 6,3 ermittelt. Im Akzeptorkompartiment wurde, um den physiologischen Bedingungen nahe zu sein, ein pH von 7,0 gewählt. Die HPLC-Analytik der aus dem Akzeptor (SPP pH 7,0) entnommenen Proben zeigte zwei Peaks mit Retentionszeiten von 2,76 min und 4,59 min, wobei letzterer der Ausgangsverbindung ZK 216771 zuzuordnen war. Wie eine orientierende Stabilitätskontrolle in Lösung (Tabelle 28) ergab, verläuft der ZK-Abbau zeitabhängig (vgl. auch Angaben des Herstellers unter Theoretische Grundlagen, III.3.4).

**Tabelle 28: Stabilität von ZK 216771 in SPP pH 7,0 (33°C)**

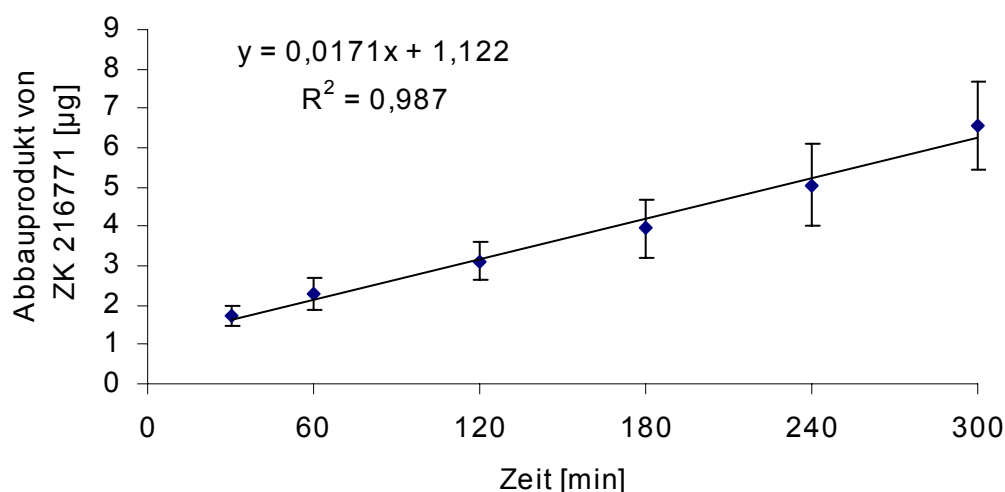
Zeit [h]	Abbaurrate [%]
1,5	5,4
2,5	8,7
3,5	11,5

Bereits nach 30minütiger Permeation konnten lediglich noch Minimalkonzentrationen an ZK 216771 im Akzeptorkompartiment nachgewiesen werden ( $0,53 \pm 0,11 \mu\text{g}$ ) und nach 60 min war der Peak für die intakte Substanz ZK 216771 (Retentionszeit 4,59 min) verschwunden. Die Konzentration des bisher nicht näher charakterisierten polareren Abbauprodukts (Retentionszeit: 2,76 min, „Reversed Phase“-Säule) nahm dagegen bis zum Versuchsende (300 min) kontinuierlich zu.

Da die Struktur dieses polareren Abbauprodukts nicht bekannt ist und somit keine HPLC-Gehaltsbestimmung mittels internem oder externem Standard möglich war, ließen sich die Konzentrationen nicht exakt bestimmen. Alternativ wurde die Ausgangsverbindung ZK 216771 als externer Standard verwendet. Die lineare Regression der zeitabhängigen

Permeationswerte ergab eine Gerade (Abb. 31) mit dem Korrelationskoeffizienten  $R^2 = 0,987$ . Bei einer Permeationsfläche von  $0,5 \text{ cm}^2$  errechnet sich daraus ein Flux zu  $0,0342 \text{ } \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$  (Theoretische Grundlagen, IV.3.1.2).

Das rasche Verschwinden der Ausgangsverbindung im Akzeptorkompartiment kann einerseits durch pH-bedingte chemische Instabilität von ZK 216771 (s. Theoretische Grundlagen, III.3.4) verursacht sein; andererseits muss auch an einen enzymatischen Abbau im cornealen Epithel gedacht werden. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob dieses Abbauprodukt pharmakologisch aktiv ist. Letzteres ist nach bisherigen Untersuchungen von SCHERING nicht der Fall [198].



**Abb. 31: Kumulative Permeabilitätsraten durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> für das polarere Abbauprodukt von ZK 216771** (Kalibrierung mit der Ausgangsverbindung); Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5)

Der Befund, dass nach 3,5 h beim Versuchs-pH-Wert von 7,0 lediglich 11,5% Zersetzung gefunden wurden (Tabelle 28), spricht eher für eine enzymatische Spaltung in der biologischen Membran (vermutlich im cornealen Epithel, da hier die Enzymaktivität am höchsten ist).

Eine Zersetzung im Donatorkompartiment ist aufgrund des pH-Wertes von 6,3 sehr unwahrscheinlich. Eine hydrolytische Spaltung durch Enzyme im cornealen Epithel könnte an der Säureamidgruppierung (s. Strukturformel, Theoretische Grundlagen, III.3.4/ III.3.5) erfolgen und zur Säurekomponente sowie zum primären Amin führen. Außerdem kann eine Hydrolyse des Benzoxazinonringes erfolgen [198]. Hier sind noch umfangreiche Untersuchungen an ZK 216771 durchzuführen.

### V.3.2. ZK 247756

#### V.3.2.1. Rezepturentwicklung

ZK 247756 und ZK 216771 unterscheiden sich durch die Substituenten am Phenylring (Theoretische Grundlagen, III.3.4/ III.3.5). Während ZK 216771 durch eine Hydroxygruppe am C 2 des Phenylrests substituiert ist, trägt ZK 247756 ein Cl-Atom in dieser Position. Weiterhin fehlt bei ZK 247756 das Br-Atom in para-Stellung zu diesem Substituenten, und ein Cyclopropylring steht anstelle von zwei Methylgruppen am C 4 des Pentanamids. Die phenolische OH-Gruppe von ZK 216771 scheint hauptverantwortlich für dessen bessere Wasserlöslichkeit (7,4 mg/l) zu sein, unterstützt durch die Bromierung in para-Stellung (-I/+M Effekt).

**Tabelle 29: Löslichkeit von ZK 247756 bei pH 4,0; nach [182]**

Lösungsmittel/Formulierung	ZK 247765 [mg/ml]
25% Ethanol	unlöslich
25% Propylenglycol	unlöslich
25% Macrogol 400	0,03
30% $\gamma$ -CD	unlöslich
30% HP- $\beta$ -CD	0,05
30% Sulfobutylether- $\beta$ -CD (Captisol <sup>®</sup> )	0,05
15% Polysorbat 80	1,290
20% Polysorbat 80	2,274
Gemischte Mizellen <sup>1</sup>	1,023

<sup>1</sup>Gemischte Mizellen: s. Material und Methoden, VI.2.7.2

ZK 247756 ist wesentlich schlechter wasserlöslich (2,6 mg/l), weshalb auch die für ZK 216771 entwickelte Rezeptur (Material und Methoden, VI.2.7.1) nicht zum Erfolg führte. Ein erprobter Zusatz von Propylenglykol (bis zu 15%) zu dem in Ethanol gelösten ZK 247756 war ebenfalls nicht erfolgreich.

Vorhergehende, von Renz et al. [182] bei pH 4,0 durchgeführte Löslichkeitsstudien sind in Tabelle 29 zusammengefasst und zeigen bescheidene Erfolge. Lediglich hochkonzentrierte

Polysorbat 80-Lösungen (15/20%) erbrachten Löslichkeiten im auch hier angestrebten Bereich von 0,12-1%. Obwohl eine hochkonzentrierte Tensidlösung zur ophthalmologischen Anwendung nicht optimal sein dürfte, wurde die 20%ige Polysorbat-Lösung (allerdings bei einem pH-Wert von 6,3) in die Permeationsstudien einbezogen.

Da für die vorgesehenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche eine Formulierung, in der ZK 247756 in gelöster Form vorliegt, angestrebt wurde, war eine weitere Idee, diese extrem schwer lösliche Substanz durch Anwendung einer Mikroemulsion (ME) als lösungsvermittelnde Grundlage zu formulieren. In unserer Arbeitsgruppe lagen bezüglich der Solubilisierung schwerlöslicher Substanzen in MEen bereits Erfahrungen vor [17, 184]. Deshalb wurde die in Tabelle 30 aufgeführte ME-Rezeptur von WENDORFF und KEIPERT [241] auf ihre Eignung überprüft.

**Tabelle 30: Mikroemulsion (ME) zur okularen Anwendung; nach [241]**

Hilfsstoffe	Anteile
Rizinusöl	1 T
Cremophor® RH 40	4 T
Macrogol 300	2 T
Wasser für Injektionszwecke	13 T

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser ME (Tabelle 30) sind für eine ophthalmologische Anwendung geeignet, was bereits durch die reizlose Verträglichkeit in Tierversuchen (Kaninchen) bestätigt werden konnte [241].

Jedoch konnte ZK 247756 auch mit Hilfe dieses tensidhaltigen Mehrkomponentensystems nicht in ausreichender Konzentration (mindestens 0,12%ig) in Lösung gebracht werden. Erst durch zusätzliche Einarbeitung von 15% HP- $\gamma$ -CD (s. Material und Methoden, VI.2.7.2) war ZK 247756 in einer Konzentration von 0,25% (entsprechend der Formulierungsentwicklung von ZK 216771) zu lösen. Es resultierte die in Tabelle 32 aufgeführte Rezeptur (ME-CD-SEGRA).

**Tabelle 31: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Mikroemulsion (ME);**  
nach [241]

Parameter	Meßgröße
Aussehen	klar
Viskosität	14,4 mPas (25°C)
Oberflächenspannung	40,2 mN/m (RT)
Brechungsindex	1,381 (25°C)
pH	5,67 (RT)
Osmolalität	1190 mOsmol/kg
Leitfähigkeit	202,02 $\mu$ S/cm (25°C)
Dichte	1,031 g/cm <sup>3</sup> (25°C)
Partikeldurchmesser (bezogen auf Viskosität u. Brechungsindex der a. Zubereitung/ b. von Wasser)	a. 9/ b. 112 nm

Ein präziser Herstellungsgang, bei dem zunächst der Wirkstoff mit dem CD-Derivat in wenig ME anzurühren und sukzessive bis zur Klarheit mit weiteren ME-Anteilen unter Rühren aufzufüllen war, musste eingehalten werden.

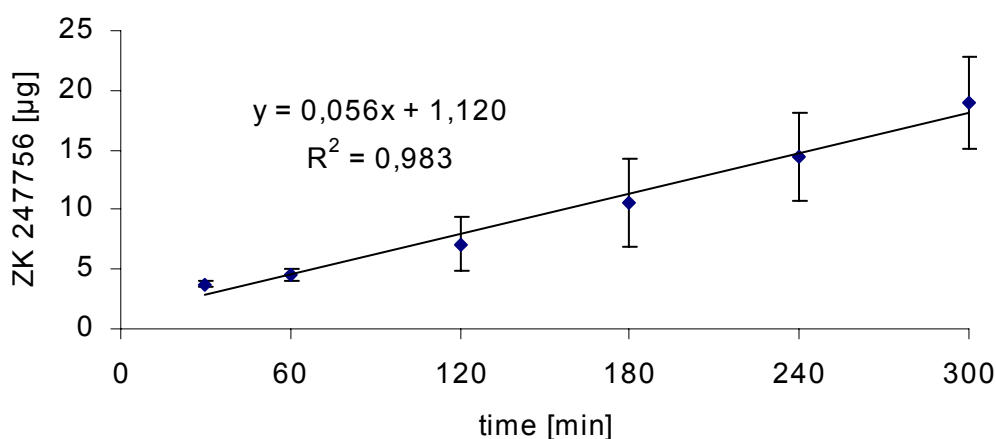
**Tabelle 32: Augentropfenrezeptur für ZK 247756**  
(Mikroemulsionsbasis; ME-CD-SEGRA)

Substanzen	Einwaage [g]
ZK 247756	0,025
HP- $\gamma$ -CD	1,5
Mikroemulsion nach Tabelle 30	ad 10,0

Auf systematische Lösungsversuche unter Variation der CD-Konzentration musste aufgrund von Substanzmangel an ZK 247756 bedauerlicherweise verzichtet werden, so dass keine Optimierung erfolgen konnte. Mit 10% HP- $\gamma$ -CD – in dieser Konzentration kann man von einer guten okularen Verträglichkeit ausgehen – in der Mikroemulsion war allerdings noch keine befriedigende Löslichkeit von ZK 247756 zu erzielen.

### V.3.2.2. In-vitro-Permeation

Bei einem Permeationsversuch der ME-CD-SEGRA (0,25% Wirkstoff) durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> (Material und Methoden, VI.2.4) war ZK 247756 im Zeitraum zwischen 30 und 300 min im Akzeptorkompartiment nicht nachzuweisen. Es bleibt offen, ob ZK 247756 in diesem Zeitraum aus der ME überhaupt zu quantitativen Mengen freigesetzt wurde und/oder eine längere Verweilzeit (Retardierung) in der biologischen Membran (s. auch V.3.2.3) die Ursache für den negativen Nachweis im Akzeptor war. Ein mögliches Zersetzungsprodukt konnte nicht detektiert werden.



**Abb. 32: Kumulative Permeationsraten von ZK 247756 (ME-CD-SEGRA) durch die synthetische Membran Nephrophan®; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 5)**

Um den Effekt der Formulierungsparameter auf die Wirkstofffreigabe zu testen, erfolgten daher Diffusionsstudien an der hydrophilen, synthetischen Membran Nephrophan® (regenerierte Cellulose). Die Permeationrate (Abb. 32) von ZK 247756 aus der ME-Formulierung durch die synthetische Membran war sehr niedrig (Flux  $\hat{=}$  0,112 µg/(min·cm<sup>2</sup>)). Nach 300 min erreichten lediglich 18,96 µg das Akzeptorkompartiment, das entspricht 0,76% der Donatorkonzentration. Daraus ist auf starke Fixierung der Wirksubstanz in den ME-Strukturen bzw. auf Komplexbildung mit dem HP-γ-CD zu schließen.

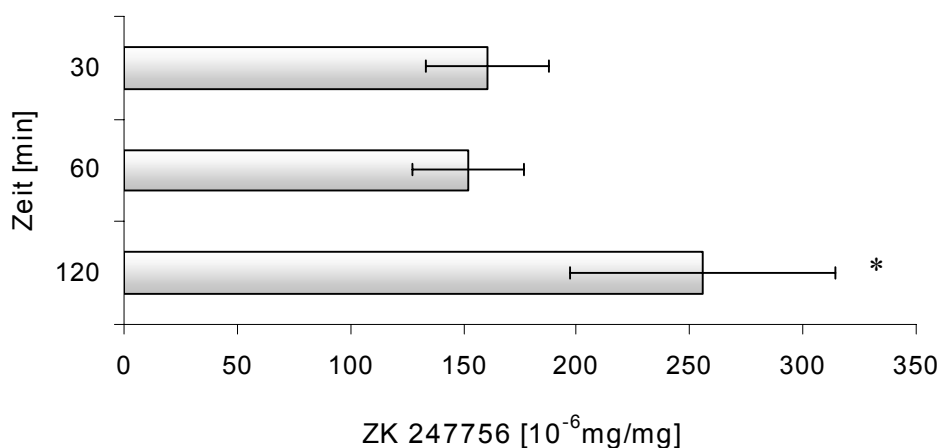
Weiterhin wurden an dieser synthetischen Membran Formulierungen von ZK 247756 in 20%iger Polysorbat 80-Lösung (0,23% ZK 247756, s. Tabelle 29) bzw. Rizinusöl (0,25% ZK 247756) orientierend getestet. Bei Permeation aus der tensidhaltigen Lösung war der Arzneistoff in Minimalkonzentrationen erst nach 240 min (1,04 µg  $\hat{=}$  0,046%) und 300 min

(3,35  $\mu\text{g} \hat{=} 0,160\%$ ) zu detektieren. Aus Rizinusöl konnten im Akzeptorkompartiment erst nach 300 min 20,6  $\mu\text{g}$  ( $\hat{=} 0,81\%$ ) nachgewiesen werden. Also resultierte auch in diesem Trägermedium eine starke Retardierung durch Mizelleinschluss bzw. Fixierung im lipophilen Rizinusöl.

Aufgrund dieser *In-vitro*-Daten konnte eine Anwendung der Rizinusöl- bzw. der Polysorbat 80-Lösung *in vivo* vorerst nicht empfohlen werden. Die Permeationsrate aus der Mikroemulsion durch die Nephrophan<sup>®</sup>-Membran war zwar sehr gering, führte aber zu einem linearen Zusammenhang zwischen der Arzneistoffkonzentration im Akzeptor und der Zeit. Eine Korrelierbarkeit mit der *In-vivo*-Verfügbarkeit ist jedoch nicht abzuleiten.

### V.3.2.3. In-vitro-Penetration

Zur Ermittlung der Wirkstoffaufnahme (Penetration) von ZK 247756 aus ME-CD-SEGRA in isolierte Schweinecornea<sup>T</sup>, wurden orientierende Versuche durchgeführt (Material und Methoden, VI.2.5). Bereits nach 30 min waren  $160,4 \cdot 10^{-6} \pm 27,3 \text{ mg/mg}$  penetriert, was bei einem durchschnittlichen Feuchtgewicht der Cornea von 177,2 mg etwa 1,136% der eingebrachten Wirkstoffkonzentration in der ME entspricht (Abb. 33).



**Abb. 33: Penetration von ZK 247756 (ME-CD-SEGRA) in isolierte Schweinecornea**, Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4); (\*) signifikant zum 30 bzw. 60 min-Wert (t-Test und Single-Factor ANOVA)

Die penetrierte Menge an ZK 247756 unterscheidet sich nach 30 und 60 min nicht signifikant. Nach 120 min ließ sich eine signifikante Steigerung um den Faktor 1,6 erfassen, was zu der Annahme berechtigt, dass ZK 247756 aus dem Trägersystem retardierend freigesetzt wird.



Diese Ergebnisse ermutigten dazu, eine *In-vivo*-Anwendung nach Keratoplastik und/oder bei endotoxininduzierter Uveitis in Betracht zu ziehen.

#### V.3.2.4. In-vivo-Studie nach Keratoplastik

Die *In-vivo*-Studie an Lewis (LEW)-Ratten unter Anwendung der ME-Formulierung mit 0,25% ZK 247756 nach Keratoplastik erwies sich als erfolgreich. Tabelle 33 und Abb. 34 fassen die Transplantatüberlebenszeit der unbehandelten Ratten im Vergleich zu den mit ME-CD (wirkstofffreies Trägersystem) bzw. ME-CD-SEGRA behandelten Tieren zusammen. Die Transplantate wurden mikroskopisch bewertet (Material und Methoden, VI.2.7.3.5).

**Tabelle 33: Mittlere Transplantatüberlebenszeit (ÜLZ) nach Keratoplastik des rechten Auges bei Lewis-Ratten**

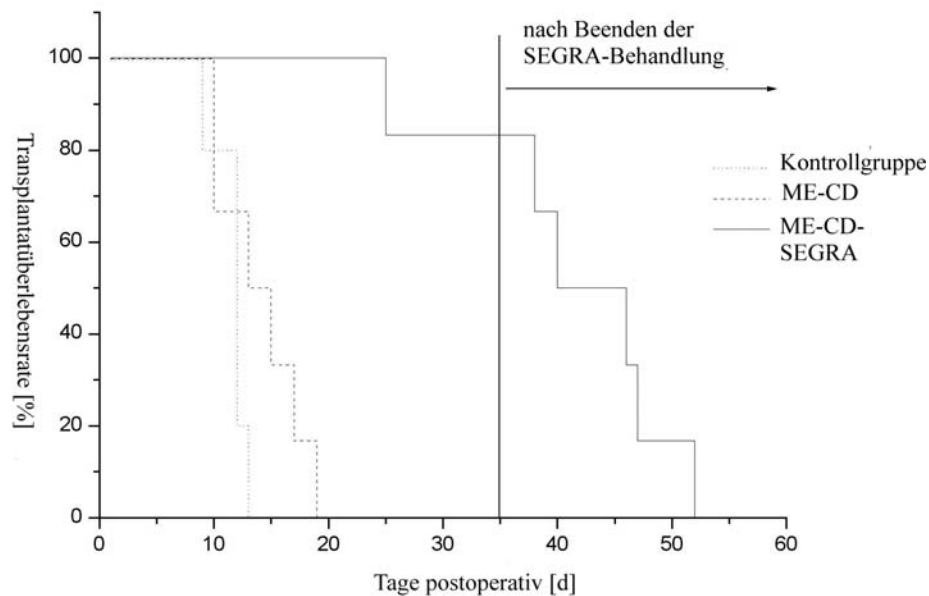
Versuchsgruppe	Therapie	ÜLZ [d]	p	n
Syngene Transplantate <sup>3</sup>				
1	keine	> 60	-	12
Allogene Transplantate <sup>3</sup>				
2	keine	11,7 ± 1,2	-	6
3	ME-CD	15,0 ± 1,5	0,114	6
4	ME-CD-SEGRA	42,2 ± 4,0	0,00003	6

Bei Ratten, die syngene Transplantate erhielten (Gruppe 1, Tabelle 33), blieb das Transplantat über 60 Tage klar und wurde nicht abgestoßen. Alle unbehandelten, allogenen Transplantate wurden innerhalb von 2 Wochen (11,7 ± 1,2 d) abgestoßen. Behandlung mit ME-CD führte zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der Transplantatüberlebenszeit (15,0 ± 1,5 d) verglichen mit der Referenz (Gruppe 2, Tabelle 33). Im Gegensatz dazu zeigten alle mit ME-CD-SEGRA (Gruppe 4, Tabelle 33) behandelten Tiere eine hohe (im Vergleich zu Gruppe 2 u. 3 signifikant höhere) Transplantatüberlebenszeit (42,2 ± 4,0 d). Wurde die Therapie mit ME-CD-SEGRA abgebrochen, erfolgte anschließend eine Transplantatabstoßung.

Die Therapie mit ME-CD bzw. ME-CD-SEGRA wurde von allen Tieren gut vertragen.

<sup>3</sup>Erklärung, s. Material und Methoden, VI.2.7.3.4

Postoperative Komplikationen, wie Infektion, Verlust der Vorderkammer, Ausbildung vorderer Synechien oder Kataraktausbildung [160], traten nicht auf.



**Abb. 34: Transplantatüberlebensrate/zeit nach Keratoplastik bei Lewis-Ratten**

Diese Ergebnisse belegen, dass die lokale Anwendung der ophthalmologischen ZK 247756-Formulierung, die auf der Basis einer HP- $\gamma$ -CD-haltigen Mikroemulsion als transparente Lösung vorlag, eine hocheffektive Therapie zur Verhinderung der Transplantatabstoßung im tierexperimentellen Modell darstellt [164].

Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind Ziel gegenwärtiger, weiterführender Untersuchungen. Ferner sind *In-vivo*-Studien an Ratten nach endotoxininduzierter Uveitis in Planung.

Um die Auswirkung der SEGRA-Therapie auf die Cytokinexpression im Transplantat zu untersuchen, wurden zusätzliche Tiere für PCR-Studien verwendet. Der 7. postoperative Tag wurde für diese Analyse gewählt, da zu dieser Zeit auch unbehandelte Tiere noch keine Abstoßungsreaktion erwarten ließen. Tatsächlich waren alle Transplantate zu diesem Zeitpunkt klar. Die Therapie des cornealen Transplantats mit ME-CD-SEGRA verminderte die mRNA-Spiegel aller untersuchten Cytokine und T-Zell-Marker (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 und CD3). Für IL-4 war diese Abnahme signifikant gegenüber der nichtbehandelten

Kontrollgruppe. Detaillierte Ergebnisse finden sich in der Publikation von PLEYER et al., im Druck 2004 [164].

### V.3.3. Kapitelzusammenfassung

- Die Sättigungslöslichkeit von ZK 216771 in wässrigen CD-Lösungen war für HP- $\gamma$ -CD (20 bzw. 30%) am höchsten und erreichte gerade einen therapeutisch relevanten Bereich (0,12-1%). Dieser hohe, erforderliche CD-Zusatz scheint allerdings für eine realistische Augentropfenformulierung ungeeignet.
- Um ZK 216771 bei gleichzeitiger Reduktion des HP- $\gamma$ -CD-Anteils auf 10% ausreichend lösen zu können (0,25%), wurde ein spezielles Herstellungsverfahren entwickelt, bei dem der Arzneistoff mit 2% Ethanol angelöst wurde.
- Bei der *In-vitro*-Permeation dieser Formulierung konnte ZK 216771 lediglich nach 30 min in Minimalkonzentrationen im Akzeptorkompartiment nachgewiesen werden. Die Konzentration eines nicht näher charakterisierten, polareren Abbauproduktes nahm hingegen bis zum Versuchsende (300 min) linear zu. Dieses Abbauprodukt – höchstwahrscheinlich erfolgt eine enzymatische Spaltung im cornealen Epithel – ist nach bisherigen Erkenntnissen nicht pharmakologisch aktiv.
- Die äußerst schwerlösliche Substanz ZK 247756 konnte mit Hilfe einer HP- $\gamma$ -CD-haltigen Mikroemulsion (ME) 0,25%ig in Lösung gebracht werden (ME-CD-SEGRA).
- Bei einem Permeationsversuch von ME-CD-SEGRA durch isolierte Schweinecornea<sup>T</sup> war ZK 247756 zu keinem Zeitpunkt nachzuweisen. Ein analoger Versuch mit synthetischer Membran ergab eine sehr niedrige Permeationsrate von ZK 247756 (Flux = 0,112  $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ ).
- Penetrationsstudien an isolierter Schweinecornea<sup>T</sup> von ZK 247756 in ME-CD führten zu einer Wirkstoffaufnahme von 1,136% nach 30 min.
- Eine Behandlung von Ratten mit ME-CD-SEGRA nach Keratoplastik zeigte eine hochsignifikant erhöhte Transplantatüberlebenszeit gegenüber einer „Vehikel“ (ME-CD)-Gruppe bzw. einer unbehandelten Kontrollgruppe.

## VI. MATERIAL UND METHODEN

### VI.1. Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller	Ort	Land
<i>Arzneistoffe</i>			
Pilocarpinhydrochlorid (P)	E. Merck	Darmstadt	D
Pindolol (PIN)	Kanoldt Arzneimittel	Ismaning	D
Mepindololsulfat (MEP)	Schering AG <sup>4</sup>	Berlin	D
Metoprololtartrat (MET)	Astra <sup>4</sup>	Wedel	D
Betaxololhydrochlorid (BET)	Alcon Pharma <sup>4</sup>	Freiburg	D
Alprenololhydrochlorid (ALP)	Astra <sup>4</sup>	Wedel	D
Oxprenololhydrochlorid (OXP)	Ciba-Geigy <sup>4</sup>	Basel	CH
Mycophenolatmofetil (MMF)	Roche Bioscience <sup>5</sup>	Palo Alto	USA
Mycophenolsäure (MPA)	Roche Bioscience <sup>5</sup>	Palo Alto	USA
ZK 216771	Schering AG	Berlin	D
ZK 247756	Schering AG	Berlin	D
<i>Cyclodextrine</i>			
$\alpha$ -Cyclodextrin ( $\alpha$ -CD)			
ALPHA W6 pharma	Wacker-Chemie <sup>6</sup>	Burghausen	D
$\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD)			
	Serva Feinbiochemika	Heidelberg	D
$\gamma$ -Cyclodextrin ( $\gamma$ -CD)			
GAMMA W8	Wacker-Chemie <sup>6</sup>	Burghausen	D

<sup>4</sup>An dieser Stelle sei der Schering AG, Berlin; der Firma Astra, Wedel; Alcon Pharma, Freiburg und Ciba-Geigy, Basel für die kostenlose Überlassung der Betablocker-Substanzproben gedankt.

<sup>5</sup>Der Firma Roche Bioscience, Palo Alto, USA, danke ich für die kostenlose Überlassung von Mycophenolatmofetil und Mycophenolsäure.

<sup>6</sup>Herrn Dr. Jens Moldenhauer, Wacker-Chemie, Burghausen, sei hiermit ganz besonders für die unkomplizierte und immer schnelle Lieferung der Cyclodextrin-Gratisproben gedankt.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin (HP- $\alpha$ -CD), ALPHA W& HP 0.6	Wacker-Chemie <sup>6</sup>	Burghausen	D
Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), BETA W7 HP 0,58-0,73	Wacker-Chemie <sup>6</sup>	Burghausen	D
Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD), GAMMA W8 HP 0.6 Molare Substitution: 0,5-0,7	Wacker-Chemie <sup>6</sup>	Burghausen	D
$\alpha$ -Cyclodextrin-Polymer ( $\alpha$ -CD-Pol)	Cyclolab	Budapest	HU
Carboxymethyliertes $\alpha$ -Cyclodextrin-Polymer (CM- $\alpha$ -CD-Pol)	Cyclolab	Budapest	HU
<b><i>Pufferlösungen</i></b>			
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	E. Merck	Darmstadt	D
Glutathion, oxidierte Form	Sigma-Aldrich Chemie	Schnelldorf	D
Kaliumchlorid (KCl)	Ferak Laborat	Berlin	D
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Laborchemie Apolda	Apolda	D
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Ferak Laborat	Berlin	D
Natriumchlorid (NaCl)	Wasserfuhr	Bonn	D
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	E. Merck	Darmstadt	D
Natriummonohydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Laborchemie Apolda	Apolda	D
Natriummonohydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	Laborchemie Apolda	Apolda	D
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Ferak Laborat	Berlin	D
<b><i>Verteilungskoeffizient</i></b>			
1-Octanol	E. Merck	Darmstadt	D
<b><i>Elektronenmikroskopie</i></b>			
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Sigma-Aldrich Chemie	Schnelldorf	D
<b><i>Entwicklung der SEGRA-Formulierungen</i></b>			
Benzalkoniumchlorid (BAC)	E. Merck	Darmstadt	D
Cremophor <sup>®</sup> RH 40	Caesar & Lorenz	Hilden	D

Substanz	Hersteller	Ort	Land
Glycerol 85%	Wasserfuhr	Bonn	D
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Syntapharm	Mülheim/ Ruhr	D
Pharmacoat 606 <sup>®</sup>			
Macrogol 300	Caesar & Lorenz	Hilden	D
Propylenglycol	Wasserfuhr	Bonn	D
Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat (Tween 80 <sup>®</sup> ) HLB 18,2	E. Merck	Darmstadt	D
Rizinusöl	Caesar & Lorenz	Hilden	D
<b>Gewebeaufarbeitung (Kaninchenauge)</b>			
Dimethylsulfoxid (DMSO)	E. Merck	Darmstadt	D
Tert-butyl-methyl-ether (TBME)	Sigma-Aldrich Chemie	Schnelldorf	D
<b>HPLC</b>			
Acetonitril	J. T. Baker	Deventer	NL
Methanol	J. T. Baker	Deventer	NL
Triethylamin	J. T. Baker	Deventer	NL
Phosphorsäure 85%	Laborchemie Apolda	Apolda	D

*Glutathion-Bicarbonat-Ringerlösung pH 7,4 (GBR pH 7,4)*

**GBR I**

**Einwaage [g]**

Natriumchlorid (NaCl)	6,2
Kaliumchlorid (KCl)	0,36
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	2,455
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0,105
Aqua purificata	ad 500 ml

**GBR II**

Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0,115
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,160
Glucose	0,90
ox. Glutathion	0,090
Aqua purificata	ad 500 ml

GBR I und GBR II wurden getrennt hergestellt, gemischt und mit Phosphorsäure 85% auf pH 7,4 eingestellt.

*Phosphatpuffer nach Sørensen pH 6,0/7,0/7,4 (SPP pH 6,0/7,0/7,4)* wurde entsprechend der Vorschrift nach [173] hergestellt.

Kaliumdihydrogenphosphatlösung: 9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000 ml

Dinatriumphosphatlösung: 11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml

pH-Wert (bei 18°C)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung [ml]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung [ml]
6,0	88,0	12,0
7,0	39,0	61,0
7,4	19,2	80,8

## VI.2. Methoden

### VI.2.1. Physikalisch-chemische Methoden

#### VI.2.1.1. Viskosität

Die *kinematische Viskosität*  $\nu$  [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ] der verwendeten wässrigen Lösungen wurde mit dem Kapillarviskosimeter nach *Ubbelohde* mit hängendem Kugelniveau (Schott Geräte, Hofheim a. Ts., D) bei einer Versuchstemperatur von 25°C (Durchsichtthermostat CT 1450/2 und AVS 350, Schott, Hofheim a. Ts., D) bestimmt ( $n = 5-8$ ). Unter Einbeziehung der *Dichte*  $\rho$  ließ sich aus der *kinematischen Viskosität*  $\nu$  die jeweilige *dynamische Viskosität*  $\eta$  berechnen:

$$\eta = \nu \cdot \rho \text{ [mPa}\cdot\text{s]}$$

#### VI.2.1.2. Dichte

Die Dichte der verwendeten Lösungen wurde mit dem Densitometer (density meter DMA 38, Paar, Graz, A) bestimmt. Das Messprinzip des Gerätes beruht darauf, dass die Untersuchungsflüssigkeit bei einer Messtemperatur von 25°C in einem U-förmig gebogenen Rohr in Schwingung versetzt wird. Je höher die Dichte der Flüssigkeit, desto größer ist die an der Schwingung beteiligte Masse und desto länger dauert die Schwingung. Aus der

gemessenen Schwingungsdauer kann – nach vorausgegangener Kalibrierung mit bidestilliertem Wasser – die Dichte der Untersuchungslösung mit einer Messgenauigkeit von  $\pm 10^{-3}$  [g/cm<sup>3</sup>] errechnet werden (n = 5).

#### VI.2.1.3. Oberflächenspannung

Zur Ermittlung der statischen Oberflächenspannung  $\sigma$  [mN/m] wässriger Lösungen wurde das Ring-Tensiometer TE 1C (Messgerätewerk Lauda, Dr. D. Wobser KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) bei 32°C verwendet. Jede Lösung wurde fünfmal vermessen.

#### VI.2.1.4. Osmolalität

Die Bestimmung des osmotischen Drucks  $\pi$  [mOsmol/kg] wässriger Arzneistoff- oder CD-Lösungen erfolgte mit einem automatischen Halbmikro-Osmometer (Knauer GmbH, Berlin, D). Das Probenvolumen betrug jeweils 150  $\mu$ l. Die Kalibrierung erfolgte mit destilliertem Wasser auf 0 mOsmol/kg und mit einer 1,2687%igen wässrigen NaCl-Lösung auf 400 mOsmol/kg.

#### VI.2.1.5. pH-Wert

Der pH-Wert der verwendeten Lösungen wurde mittels pH-Meter Typ CG 825 (Schott-Geräte GmbH, Hofheim a. Ts., D) bestimmt. Die Kalibrierung der Messinstrumente erfolgte mit drei pH-Pufferlösungen (pH 4,01; pH 7,00 und pH 9,21; Mettler Toledo GmbH, Steinbach, D) bei Raumtemperatur.

#### VI.2.1.6. Leitfähigkeit

Bei einer Temperatur von 25°C wurde die Bestimmung der Leitfähigkeit [ $\mu$ S/cm] am Konduktometer Typ KM2 (MLW Labortechnik Ilmenau, D) durchgeführt.

Mit Hilfe einer 0,01 N KCl-Lösung wurde die Messzellenkonstante C mit einem Wert von 0,338 cm<sup>-1</sup> ermittelt. Als Messgröße wurde der Leitwert G bestimmt und durch Multiplikation mit der Messzellenkonstanten C in die Leitfähigkeit umgerechnet. Das vortemperierte Mikroemulsionssystem wurde nach kurzem Umschütteln in die Messzelle gefüllt und nach 2 min vermessen. Es wurden 5 Bestimmungen vorgenommen.

#### VI.2.1.7. Verteilungskoeffizient

Das Verteilungsverhalten von Arzneistoffen zwischen einer hydrophilen Phase (Wasser oder



Pufferlösung) und einer lipophilen Phase (1-Octanol) kann durch den Verteilungskoeffizienten  $V_K$  charakterisiert werden. Als Pufferlösung wurde Phosphatpuffer nach Sørensen oder GBR-Puffer verwendet. Zur Bestimmung des  $V_K$  wurden 10,0 ml der Lösung der zu untersuchenden Substanz im Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen puffergesättigten Octanols versetzt (Dreifachbestimmung) und 15 min manuell geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und anschließend einem geeigneten Verfahren zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts (s. Material und Methoden, VI.2.2) unterzogen. Der scheinbare  $V_K$  wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$V_K = \frac{V_W \cdot (c_0 - c)}{V_L \cdot c_t}$$

$V_W$  = Volumen der wässrigen Phase [ml]

$V_L$  = Volumen der lipophilen Phase [ml]

$c_0$  = Arzneistoffkonzentration in der wässrigen Phase bei Versuchsbeginn [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$c_t$  = Arzneistoffkonzentration in der wässrigen Phase bei Versuchsende [ $\mu\text{g/ml}$ ]

#### VI.2.1.8. Partikeldurchmesser

Der Partikeldurchmesser der verwendeten MEen wurde mittels *Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)* bestimmt. Die PCS wird zur Bestimmung mittlerer Teilchengrößen von Emulsionen, Suspensionen, Liposomen und MEen angewendet. Der Messbereich dieser Methode ist die Schnelligkeit, da für die Messungen lediglich der Brechungsindex und die Viskosität des Dispersionsmediums vorbestimmt werden müssen [77, 144].

Die PCS ist ein Messverfahren auf der Basis von Laserlichtstreuung. Dabei wird ein Laserstrahl durch eine Küvette gesandt, in der sich die Probe befindet. Jedes Partikel streut einen Teil des einfallenden Laserlichts [72]. Das Streulicht im 90° Winkel wird mit einem Elektronenählrohr detektiert. Das analoge Streulichtsignal wird digitalisiert und einem Korrelator zugeleitet, der daraus die Korrelationsfunktion erstellt. Der Computer analysiert die Daten und errechnet daraus den Diffusionskoeffizienten der Teilchen. Dieser Wert wird in der Stokes-Einstein-Gleichung verwendet, um den mittleren Teilchendurchmesser zu berechnen [77].

## VI.2.2. Gehaltsbestimmungen

Alle im Folgenden beschriebenen Gehaltsbestimmungen erfolgten mittels *Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC: High Pressure/Performance Liquid Chromatography)*.

In der HPLC erfolgt zunächst eine Stofftrennung, wobei die mobile Phase mittels einer Hochdruckpumpe durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepresst wird. Dabei wird der Analyt reversibel an die stationäre Phase gebunden (und wieder freigegeben). Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der Substanzen zum Säulenmaterial (z.B. alkylierte Kieselgele) wird das Stoffgemisch getrennt. Nach der chromatographischen Trennung erlauben geeignete Detektoren, z.B. Foto- oder Fluorimeter, eine selektive und hochempfindliche qualitative und quantitative Erfassung der Komponenten. Das erzeugte Detektorsignal wird nach Verstärkung einer Registriereinheit, z.B. einem Integrator, zugeführt und grafisch aufgezeichnet. Die Fläche unter dem Peak, die sich proportional zur Konzentration der zu bestimmenden Substanz verhält, wird berechnet. Durch Kalibrierung mit einem internen oder externen Standard lässt sich die Konzentration der zu messenden Substanz berechnen [190].

Die *Kalibrierung* erfolgte jeweils durch einen externen Standard in einem Konzentrationsbereich, in dem auch die unbekannten Konzentrationen zu erwarten waren. Bei Lösungen (z.B. Gewebeaufarbeitung der *In-vivo*-Studien am Kaninchen), bei denen der Konzentrationsbereich völlig unbekannt war, wurde die Kalibrierung zuerst geschätzt und dann entsprechend angepasst, so dass die Unbekannten im Datenschwerpunkt lagen. Die Kalibrierung erfolgte mittels *linearer Regression*, die von folgenden Voraussetzungen ausgeht [50] (Validierung der Kalibrierung):

1. Die unabhängige Variable wird als fehlerfrei angesehen.
2. Es liegen Stichproben vor, die einer Normalverteilung gehorchen.
3. Die Streuungsmaße in den Einzelstichproben  $y_x$  müssen innerhalb des Arbeitsbereiches von  $x_{\min}$  bis  $x_{\max}$  gleich groß bzw. statistisch nicht unterscheidbar sein (Varianzenhomogenität, Gleichheit der Varianzen).
4. Die Zufallsvariablen  $y_i$  dürfen nicht voneinander stochastisch abhängig sein, d.h. die Daten dürfen z.B. keinen Trend aufweisen.
5. Es muss ein linearer Zusammenhang zwischen der Messgröße  $y$  und der Zustandsgröße  $x$  bestehen.

Vor jeder neuen Messreihe wurde eine Kalibrierfunktion erstellt.

Für die unter VI.2.2.1 - VI.2.2.4 beschriebenen HPLC-Gehaltsbestimmungen galten folgende Bedingungen:

<b>Pumpe</b>	Pump L-6200 A, E. Merck-Hitachi (Tokio, J)
<b>Detektor</b>	Diode Array Detector L-4500, E. Merck-Hitachi (Tokio, J)
<b>Interface</b>	Interface D-6000, E. Merck-Hitachi (Tokio, J)
<b>Software</b>	D 6000 HPLC-Manager Version 2, Rev. 3, E. Merck (Darmstadt, D) & Hitachi Instr. Inc. (San Jose, CA, USA)
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µl

#### VI.2.2.1. Pilocarpin-HCl

Die Gehaltsbestimmung von Pilocarpin-HCl erfolgte in Anlehnung an die Methode nach WIESEND [243]. Insgesamt bestanden folgende Versuchsbedingungen:

<b>HPLC-Gehaltsbestimmung (Pilocarpinhydrochlorid)</b>	
<b>Stationäre Phase</b>	LiChrospher 100 <sup>®</sup> RP-18 (5 µm), LiChroCART <sup>®</sup> 125x4 mm, E. Merck (Darmstadt, D)
<b>Mobile Phase</b>	800 ml Wasser werden mit 6 ml (0,105 mol) Phosphorsäure 85%, 5 ml (0,036 mol) Triethylamin und 10 ml Methanol versetzt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (20°C)
<b>Externer Standard</b>	Pilocarpin-HCl
<b>Flussrate</b>	1,5 ml/min (isokratisch)
<b>Temperatur</b>	Raumtemperatur
<b>Wellenlänge</b>	216 nm
<b>Retentionszeit</b>	3,5 min

#### VI.2.2.2. Betablocker

Die Methode zur Bestimmung der einzelnen Betablocker wurde nach orientierenden Angaben von „XTerra Columns Applications Notebook“ modifiziert. Der Eluent bestand aus einem Phosphatpuffersystem und Acetonitril. Der Acetonitrilanteil der mobilen Phase variierte entsprechend der unterschiedlichen Lipophilie der Substanzen. Im Detail lagen folgende Versuchsbedingungen vor:

---

**HPLC-Gehaltsbestimmung (Betablocker)**

---

**Stationäre Phase** LiChrospher 100<sup>®</sup> RP-18 (5 µm), LiChroCART<sup>®</sup> 125x4 mm  
E. Merck (Darmstadt, D) & Hitachi Instr. Inc. (San Jose, CA, USA)

**Mobile Phase** A: Elchpuffer  
(10 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5% (V/V)  
Triethylamin; eingestellt auf pH 3,0 mit Phosphorsäure 85%)  
B: Acetonitril  
Mischungsverhältnis variabel

Betablocker	A: Elchpuffer <sup>1</sup>	B: Acetonitril <sup>1</sup>	Retentionzeit:
Pindolol	85%	15 %	t = 2,7 min
Mepindololsulfat	73%	27%	t = 3,5 min
Metoprololtartrat	75%	25%	t = 3,4 min
Betaxolol-HCl	55%	45%	t = 3,8 min
Alprenolol-HCl	50%	50%	t = 3,5 min
Oxprenolol-HCl	70%	30%	t = 3,6 min

**Externe Standards** Betablocker (s.o.)

**Flussrate** 0,6 ml/min (isokratisch)

**Temperatur** Raumtemperatur<sup>a</sup>

**Wellenlänge** 215 nm

---

<sup>1</sup> gültig für Raumtemperatur (22 ± 0,5 °C). A/B-Verhältnis musste bei extrem hohen Außentemperaturen allerdings verändert werden.

Da die HPLC-Analytik in einem nicht-klimatisierten Raum stattfand und die HPLC-Anlage (insbesondere die Säule) nicht gleichmäßig temperiert werden konnte, war diese Methode – aufgrund von hohen Außentemperaturen im Sommer – starken Temperaturschwankungen ausgesetzt. Dies führte zu temperaturabhängig veränderten Retentionszeiten. Die Retentionszeit konnte durch Variation des Acetonitril-Anteils modifiziert werden. Vor jeder Messreihe wurde eine neue Kalibrierfunktion erstellt.

#### VI.2.2.3. Mycophenolatmofetil / Mycophenolsäure

Die HPLC-Analytik zur Bestimmung von MMF und MPA erfolgte nach [58]:

<b>HPLC-Gehaltsbestimmung (Mycophenolatmofetil/Mycophenolsäure)</b>	
<b>Stationäre Phase</b>	Merck LiChroCart®, LiCrospher® 100 RP-18 (5 µm)
<b>Mobile Phase</b>	A: 0,1% Phosphorsäure 85% in bidestilliertem Wasser B: Acetonitril <i>MMF</i> : 25% A; 75% B <i>MPA</i> : 60% A; 40% B
<b>Externe Standards</b>	MMF/MPA
<b>Bestimmungsgrenze</b>	<i>MMF</i> : 0,11 µg/ml <i>MPA</i> : 0,04 µg/ml
<b>Flussrate</b>	1,0 ml/min (isokratisch)
<b>Temperatur</b>	Raumtemperatur
<b>Wellenlänge</b>	214 nm
<b>Retentionszeit</b>	<i>MMF</i> : 7,7-8,0 min (temperaturabhängig) <i>MPA</i> : 5,5-5,8 min (temperaturabhängig)

#### VI.2.2.4. ZK 216771 / ZK 247756

<b>HPLC-Gehaltsbestimmung (ZK 216771, ZK 247756)</b>	
<b>Stationäre Phase</b>	<i>Säule</i> : Thermo Hypersil-Keystone 22103-038 HyPURITY® C18 3 µm, 100 x 3mm <i>Vorsäule</i> : Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl), AJO-4286 4mmL x 2.0 ID
<b>Externe Standards</b>	ZK 216771, ZK 247756
<b>Bestimmungsgrenze</b>	ZK 216771/ZK 247756: 0,13 µg/ml
<b>Temperatur</b>	Raumtemperatur
<b>Wellenlänge</b>	240 nm
<b>Retentionszeit</b>	ZK 216771: 4,59 min ZK 247756: 6,6-7,25 min (temperaturabhängig)

Die quantitative Bestimmung der verwendeten SEGRAs wurde nach der Methode von SCHERING so verändert, dass sie für die zur Verfügung stehenden Geräte unkompliziert war. Diese Modifizierung bezog sich in erster Linie auf die Optimierung des Gradienten:

<b>HPLC-Gehaltsbestimmung (ZK 216771, ZK 247756)</b>					
<b>Mobile Phase</b>	A: 0,05% Ameisensäure in bidestilliertem Wasser				
	B: 0,05% Ameisensäure in Acetonitril				
<b>Gradient:</b>	Schritt	Zeit [min]	%A	%B	Flussrate [ml/min]
	1	0.0	50	50	0.4
	2	5.0	20	80	0.4
	3	5.1	5	95	0.4
	4	8.1	5	95	0.4
	5	10.0	50	50	0.4
	6	20.0	50	50	0.4

#### VI.2.2.5. Cyclodextrine

Die Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichts infolge des Einflusses einer optisch aktiven Verbindung ist von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichts, von der Temperatur, vom Lösungsmittel, vom pH-Wert, von der Schichtdicke der Küvette und von der Konzentration des jeweiligen Stoffs abhängig. Der Gehalt an CD, einer optisch aktiven Substanz, kann somit in wässriger Lösung über eine Messung des Drehwinkels quantitativ bestimmt werden. Die Konzentration  $c$  [g/100 ml] einer optisch aktiven Verbindung ist bei Kenntnis der spezifischen Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  durch folgende Gleichung gegeben:

$$c = \frac{1000 \cdot \alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l}$$

$c$  = Konzentration [g/100 ml]

$\alpha$  = gemessener Drehwinkel [°]

$[\alpha]_D^{20}$  = spezifische Drehung [°]

$l$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

<b>Polarimetrie (CDe)</b>	
<b>Lampe</b>	Quecksilberlampe ( $\lambda = 253, 652 \text{ nm}$ )
<b>Detektor</b>	Photomultiplier RCA 1P28A
<b>Polarisator/Analysator</b>	Glas-Prismen aus Kalkspat
<b>Küvette</b>	ORD-Küvette, Quarz (Schichtdicke: 2,0 cm, Volumen: 1,3 ml)
<b>Spaltbreite</b>	0,4 mm
<b>Temperatur</b>	15-25°C
<b>Integrationszeit</b>	5 s
<b>Kalibrierung</b>	Externer Standard ( $\alpha$ -CD, HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD)
<b>Richtigkeit</b>	$\pm 0,002^\circ$ für Drehwerte $\leq 1^\circ$ $\pm 0,2\%$ für Drehwerte $> 1^\circ$
<b>Empfindlichkeit</b>	$> 0,002^\circ$
<b>Präzision</b>	besser als $0,002^\circ$ (für Nullwert und Messpunkt)

### VI.2.3. Arzneistoff / Cyclodextrin-Komplexe

#### VI.2.3.1. Komplexherstellung

Mit dem leicht löslichen  $\beta$ -Blocker MEP wurden beispielhaft durch Lyophilisation feste Assoziate mit  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -CD im molaren Verhältnis 1:1 hergestellt. Dazu wurden die Substanzen in bidestilliertem Wasser gelöst, bei  $-80^\circ\text{C}$  für mindestens 24 h eingefroren und anschließend 24 h lyophilisiert (Christ-Loc-1m Alpha 1-4, Christ). Die entstandenen *Lyophilisate (LP)* sahen weiß bis gelblich, schaumstoffartig und voluminös aus. Weiterhin wurden zum Vergleich *Physikalische Mischungen (PM)* von MEP mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -CD im molaren Verhältnis 1:1 durch Verreiben (ca. 10 min) im Mörtel hergestellt. Pistill und Wände des Mörtels wurden mehrmals mit einem Kartenblatt abgeschabt, um eine effektive Durchmischung zu gewährleisten.

#### VI.2.3.2. Komplexcharakterisierung

##### VI.2.3.2.1. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Die lyophilisierten Proben bzw. die physikalischen Verreibungen (Material und Methoden,

VI.2.3.1) wurden mit Kaliumbromid (KBr) mittels Mörser und Pistill gut verrieben und zu sehr dünnen Tabletten verpresst. Die so entstandenen KBr-Presslinge wurden in eine passende Halterung gespannt und am Infrarotspektrometer (Biorad, USA) vermessen. Die Spektren wurden auf Folie kopiert und anschließend die einzelnen Banden durch Übereinanderlegen dieser Folien verglichen (Vergleich: Arzneistoff-Spektrum – CD-Spektrum – Arzneistoff/CD-Spektrum).

#### VI.2.3.2.2. Röntgendiffraktometrie<sup>7</sup> (X-RD)

Röntgenstrahlen sind energiereiche elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen von 10 nm-2 pm. Ein Untersuchungsverfahren mit Röntgenstrahlen stellt die Röntgendiffraktometrie (X-RD), eine Röntgenfeinstrukturanalyse durch Beugung weicher Röntgenstrahlen an Kristallgittern, dar [133].

In der Pharmazie werden zur Durchführung von Röntgenbeugungsuntersuchungen ausschließlich Pulververfahren eingesetzt. Das Interesse richtet sich auf die Untersuchung von Kristallmodifikationen und -veränderungen sowie auf die Untersuchung des Kristallinitätsgrads. Beim Pulververfahren wird ein feines Kristallpulver mit monochromatischer Röntgenstrahlung untersucht. Es ermöglicht ferner die Untersuchung von Substanzgemischen und von Gitterdefekten [133].

In dieser Arbeit wurden physikalische Mischungen und lyophilisierte Produkte von MEP mit ausgewählten CDe<sup>n</sup> mittels Röntgendiffraktometrie (Horizontalzählrohrgoniometer, Freiburger Präzisionsmechanik, Freiberg, D; Cu-K<sub>α</sub>-Irradiation, Scanningrate: 20/5s) untersucht. Die Röntgendiffraktogramme der Substanzmischungen wurden mit denen der Einzelsubstanzen (fein zermörsert bzw. lyophilisiert) verglichen und evaluiert.

#### VI.2.3.2.3. Löslichkeitsstudien

Für die schwerlöslichen Substanzen Pindolol und ZK 216771 wurden mit ausgewählten CDe<sup>n</sup> in abgestufter Konzentration Löslichkeitsstudien zur Charakterisierung der Komplexbildung

---

<sup>7</sup>Herrn Dr. Burghard Ziemer und Frau Petra Neubauer, Institut für Chemie, sei an dieser Stelle für die freundliche Kooperation bezüglich der Pulveranalyse durch Röntgendiffraktometrie gedankt.



durchgeführt.

Die jeweilige Sättigungslöslichkeit von PIN wurde bestimmt, indem ein Überschuss an PIN zu der betreffenden wässrigen CD-Lösung ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD und ihre hydroxypropylierten Derivate;  $\alpha$ -CD-Pol und CM- $\alpha$ -CD-Pol) unterschiedlicher Konzentration gegeben wurde. Die so entstandenen Suspensionen wurden in einem Schüttelinkubator (25°C) mindestens 15 h geschüttelt und noch mindestens 3 d bei Raumtemperatur (ungefähr 22°C) stehen gelassen. Die Suspensionen wurden anschließend membranfiltriert (Celluloseacetat, Porengröße: 0,2  $\mu$ m, NeXstar Pharmaceuticals, Inc. San Dimas, CA 91773, USA). Der Arzneistoffgehalt des Filtrats wurde nach geeigneter Verdünnung mittels HPLC ermittelt (Material und Methoden, VI.2.2).

Neben der Wasserlöslichkeit erfolgte die Bestimmung der Löslichkeit von PIN in GBR-Puffer pH 7,4 unter Zugabe 12,5%iger Lösungen von HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD. Die GBR-Löslichkeit wurde sowohl bei Raumtemperatur (s.o.) als auch nach Autoklavieren der Ansätze unter Standardbedingungen (121°C,  $2 \cdot 10^5$  Pa, 15 min; Autoklav: MM VAKULAB S 3000; Zersetzung von PIN < 5%) bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Suspensionen wurden ebenfalls mindestens 3 d bei Raumtemperatur gelagert und, wie oben beschrieben, filtriert und analysiert.

#### ZK 216771

Die Löslichkeitsstudien an ZK 216771 entsprachen prinzipiell der oben beschriebenen Methode für PIN. Jedoch wurden die wässrigen CD-Lösungen, die einen Überschuss an Arzneistoff enthielten (Miniansätze wegen Substanzmangels), mit einem Magnetprüher in einem kleinen Messzylinder (1 bzw. 2 ml) mindestens 12 h gerührt.

Ein Überschuss an ZK 216771 wurde 10/ 20/ 30%igen wässrigen CD-Lösungen zugesetzt. Das verwendete bidestillierte Wasser wies einen pH-Wert von 6,3 auf. Einige dieser Suspensionen wurden in einem Autoklaven, wie zuvor beschrieben, erhitzt und dann unter Rühren (Magnetprüher) abgekühlt (A). Andere Suspensionen enthielten zusätzlich 5% Ethanol (E). Alle Suspensionen wurden membranfiltriert (s.o.) und der Gehalt an ZK 216741 im Filtrat mittels HPLC bestimmt (Material und Methoden, VI.2.2.4).

## VI.2.4. *Wirkstoffpermeation durch isolierte Schweinecornea*

### VI.2.4.1. Präparation der Cornea

Für die Permeationsstudien an isolierter Schweinecornea wurden Bulbi frisch geschlachteter Hausschweine<sup>8</sup> unterschiedlichen Alters von den Eberswalder Fleischwerken (Eberswalde-Britz) bzw. der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow<sup>9</sup> (LVAT Ruhlsdorf, Groß Kreuz, D) verwendet.

Der Augapfel wurde makroskopisch auf corneale Integrität überprüft. Daraufhin wurde er zwischen Daumen und Mittelfinger der linken Hand fixiert (enganliegende, möglichst rutschfeste Handschuhe) und mit GBR bzw. SPP gespült. Anschließend wurde die Cornea mit einem Skalpell rund ausgeschnitten, sodass sich um das unbeschädigte Gewebe noch ein ca. 2-3 mm breiter Scleralring befand. Unter Vermeidung eines Austritts größerer Mengen an Kammerwasser oder Glaskörper wurde die ausgeschnittene Cornea mit einer chirurgischen Pinzette leicht angehoben, und ggf. noch verbliebene Scleralfasern wurden mit einer Präparationsschere durchtrennt. Die Cornea wurde anschließend vom unterseits anhaftenden Iris-Ziliarkörper abgezogen<sup>10</sup>.

---

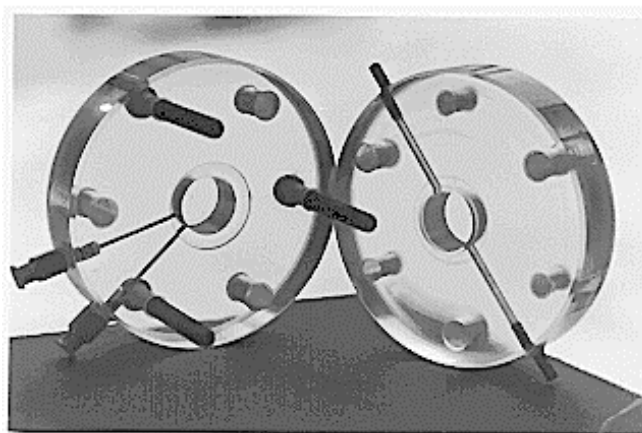
<sup>8</sup>Die Schweinecorneae wurden zunächst von den Eberswalder Fleischwerken bezogen. Die Tiere wurden dort nach der Schlachtung abgeflammt, um die Borsten zu entfernen, und anschließend durch heißen Wasserdampf („Überbrühen“) geleitet (Fließband). Diese Manipulation führte dazu, dass viele Augen beschädigt waren, was am Epithel oder durch Trübung der Augen zu erkennen war (mögliche Denaturierung der Proteine). Für die von uns durchgeführten Versuche wurden ausschließlich nach intensiver makroskopischer Begutachtung als unbeschädigt erkannte Augen verwendet. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Hitzepezedur zu Veränderungen an der Cornea führte, die sich auf das Permeationsverhalten von Arznei- und Hilfsstoffen ausgewirkt haben könnten. Nach der Schließung der Eberswalder Fleischwerke 2001 konnten Augen von der Lehr- und Versuchsanstalt (LVAT) Ruhlsdorf, Teltow, bezogen werden. Da dies nur ein kleiner Schlachthof ist, der anderen Zwecken dient als der fabrikmäßigen Schlachtung von Tieren, erfolgten keine „denaturierenden Maßnahmen“ (Überbrühen). Fast jedes von dort erworbene Auge war aufgrund eines optisch als unversehrt erkannten Epithels verwendbar. Bei den einzelnen Versuchen sind die aus Eberswalde stammenden Augen bzw. die isolierte Cornea mit <sup>E</sup> gekennzeichnet, die aus Teltow stammenden mit <sup>T</sup>.

<sup>9</sup>Für die unkomplizierte Beschaffung von Schweineaugen möchte ich mich bei Frau Uwarow (LVAT Ruhlsdorf, Groß Kreuz) bedanken.

<sup>10</sup>Frau Dr. M. Scholz danke ich für die Einweisung in die Präparationstechnik von Schweineaugen.

#### VI.2.4.2. Permeationsapparatur

Ein von unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Rindercornea-Permeationsmodell (Innendurchmesser  $d = 1,2 \text{ cm}$ , Permeationsfläche  $A = 1,13 \text{ cm}^2$ ) [208] aus Acrylglas® (Grünberg Kunststoffe, Rödermark, D) (Abb. 35) wurde für die hier durchzuführenden Versuche an die kleinere Schweinecornea angepasst ( $d = 0,8 \text{ cm}$ ,  $A = 0,5 \text{ cm}^2$ )<sup>11</sup>. Mit diesem Modell konnte der Einfluss verschiedener Hilfsstoffe, z.B. der CDe, auf die cornealen Diffusionseigenschaften des Wirkstoffs ermittelt werden.



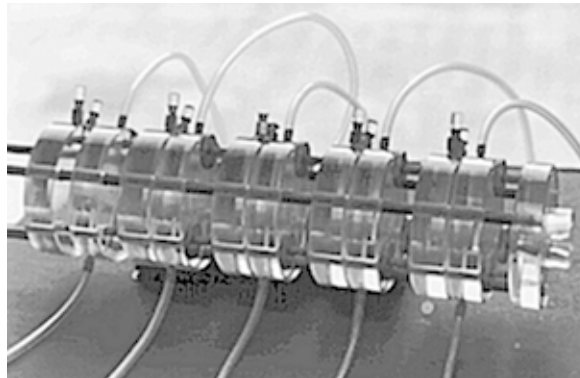
**Abb. 35: Permeationszelle**

Das Modell wurde in Anlehnung an eine in der Arbeitsgruppe etablierte Gleichgewichtsdialysezelle [105] entworfen. Es wurde so modifiziert [207], dass die Auflagefläche für die Cornea auf der Donatorseite als zirkuläre Vertiefung und auf der Akzeptorseite als ringförmige Erhebung vorliegt (Abb. 35). Diese Konstruktion gewährleistet, dass die anatomisch bedingte Krümmung der Cornea erhalten bleibt.

Das Donatorkompartiment (1 ml) wurde mit Hilfe einer 10 ml-Glasspritze befüllt. Der Verschluss der Befüllungskanäle (hohle Metallstifte) erfolgte mit Stopfen über einen Siliconschlauchadapter. Die Akzeptorflüssigkeit (zumeist GBR oder SPP, 20 ml) wurde kontinuierlich mittels einer Schlauchpumpe (ISMATEC Mehrkanal-Schlauchpumpe IP-8, ISM941/3769-00002, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D) umgepumpt.

---

<sup>11</sup>Herrn G. Glowacz, Institut für Chemie, danke ich an dieser Stelle für die Fertigung der Permeationszellen.



**Abb. 36: Permeationsapparatur für Schweinecornea und Nephrophan®**

#### VI.2.4.3. Versuchsdesign

Die Cornea der Schweineaugen wurde innerhalb von 2-3 h nach der Schlachtung der Tiere präpariert (Material und Methoden, VI.2.4.1). Dabei war insbesondere darauf zu achten, dass die Epithelschicht des Schweineauges nicht verletzt wurde. Die epitheliale Seite der Cornea war der Donatorseite zugewandt. Die beiden Zellhälften wurden mit drei Schraubenmuttern (467 Ni, Schrauben Scholz, Berlin, D) verschraubt. Die Cornea wurde so eingespannt, dass keine Faltenbildung entstand.

Die entsprechenden Lösungen (Material und Methoden, VI.2.4.4) wurden in die Donatorhalbzellen gefüllt und die Akzeptorhalbzellen durch Silikonschläuche mit den im Wasserbad auf 33°C vortemperierten Pufferlösungen (Thermostat: T Lauda, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) verbunden. Die Zellen wurden während des gesamten Versuchs (300 min) ebenfalls im Wasserbad (33°C) temperiert. Es konnten maximal 6 Zellen parallel verwendet werden (Abb. 36).

Versuche mit synthetischer Membran erfolgten mit dem künstlichen Nierenschlauch Nephrophan®, bestehend aus regenerierter Cellulose (Porengröße: 2,4 nm; Dicke: 14-15 µm, mit Sorbitol und Glycerol als Weichmacher imprägniert, Filmfabrik Wolfen, D), der vor der Verwendung ca. 1 h vorgewässert wurde. Anschließend wurden die vorbereiteten Membranen mit Hilfe einer gerundeten, feinen Schere auf eine Fläche (Durchmesser ca. 1,2 cm) zurecht geschnitten.

*Vorbehandlung der Membran:* Um eine mögliche direkte Beeinflussung der Schweinecornea durch einzelne Arzneistoffe oder Hilfsstoffe (z.B. CDe) zu klären, wurden Corneae in jeweils

2 ml der zu prüfenden Arzneistoff- oder Hilfsstofflösung für 30 min eingelegt, daraufhin mit einem isotonen Puffer pH 7,4 (SPP oder GBR) abgespült und in die Permeationszelle eingespannt. Nachfolgend wurde eine Lösung, wie unter Material und Methoden, VI.2.4, beschrieben, permeiert.

---

**Standardbedingungen bei den Permeationsuntersuchungen**

---

Donatorvolumen	1,0 ml
Akzeptorvolumen	1,0 ml
Akzeptorflüssigkeitsvolumen	20,0 ml
Akzeptormedium	GBR pH 7,4 (Betablocker) SPP pH 7,4 (CDe) SPP pH 7,0 (ZKs)
Diffusionsbarriere	Schweinecornea/Nephrophan <sup>®</sup>
Permeationsfläche	0,5 cm <sup>2</sup>
Temperatur	33° ± 0,5 C
Pumpgeschwindigkeit	80 U/min (3,5 ml/min)

---

Die *Membranvitalität* von Schweinecornea wurde in unserer Arbeitsgruppe nach [202] untersucht. Zur Prüfung der Integrität und Vitalität der isolierten Gewebe wurde der Farbstoff Fluoreszein, der epitheliale Defekte der Cornea anfärbt, verwendet [148]. Die Inkubation frisch isolierter Corneae in Fluoreszeinlösung ergab punktuell gelbe Färbungen. Nach den fünfstündigen Permeationsexperimenten traten diese Verfärbungen großflächiger auf und wurden durch Betrachtung unter UV-Licht intensiviert [202].

Als weiteres Färbemittel wurde Trypanblau-Lösung (0,4%), die ausschließlich tote Zellen anfärbt, verwendet. Diese Ergebnisse waren mit denen unter Verwendung von Fluoreszein vergleichbar [202]. Direkt nach der Isolierung waren punktuell abgestorbene Zellen durch Blaufärbung zu erkennen, die nach der Permeation häufiger und großflächiger auftraten [202].

#### VI.2.4.4. Herstellung der Lösungen

##### VI.2.4.4.1. Arzneistofflösungen

Zur Herstellung der Testlösungen unmittelbar vor dem betreffenden Permeationsversuch

erfolgten die Einwaagen direkt in entsprechende kleine Maßkolben. Zu den jeweiligen Salzen der Betablocker (Tabelle 34), die alle leicht löslich in Wasser sind, wurde unter Rühren (Magnetrührer) GBR pH 7,4 zugegeben.

**Tabelle 34: 0,5%ige Betablocker-Lösungen für die cornealen Permeationsstudien *in vitro* (berechnet auf die jeweilige Base)**

Substanzen	Einwaage [g]				
Mepindololsulfat	0,118				
Metoprololtartrat		0,128			
Betaxololhydrochlorid			0,056		
Alprenololhydrochlorid				0,057	
Oxprenololhydrochlorid					0,057
GBR pH 7,4 [ml] ad	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Für die Versuche zur Permeation von MEP in Anwesenheit ausgewählter CDe (1,85/ 3,7/ 10%  $\alpha$ -CD; 4,7/ 11,7/ 20,0 % HP- $\alpha$ -CD) wurden Ansätze mit 0,5% MEP (berechnet auf die Base) hergestellt; das entspricht einer Einwaage von 0,118g Arzneistoff ad 10,0g GBR pH 7,4. Die jeweilig eingesetzten CDe wurden zusammen mit MEP direkt in einen 10 ml Maßkolben eingewogen. Danach wurde unter Rühren (Magnetrührer) die Pufferlösung in Anteilen (bis ca.  $\frac{2}{3}$  des Endvolumens) zugegeben. Erst nach vollständigem Auflösen der Festsubstanzen wurde mit GBR pH 7,4 bis zur Messmarke aufgefüllt und ca. 1 h weitergerührt.

MEP und P-Lösungen ohne und mit 12,5% HP- $\alpha$ -, HP- $\beta$ - bzw. HP- $\gamma$ -CD wurden untereinander verglichen bzw. in Kombination gebracht. Die Konzentration an MEP betrug 0,5% (bezogen auf die Base), diejenige von P 2%. Die Herstellung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Mit dem schwerlöslichen PIN wurden 0,15%ige Lösungen hergestellt, indem HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD (12,5%) eingewogen und mit GBR pH 7,4 aufgefüllt wurde. Um klare Lösungen herzustellen, wurden die Zubereitungen mindestens 12 h bei Raumtemperatur gerührt (Magnetrührer). Bei einer PIN/HP- $\gamma$ -CD-Lösung wurde 0,001% BAC (Normaltropfenzähler) zugesetzt. Die selbst hergestellten PIN-Lösungen wurden mit dem Fertigpräparat

Pindoptan<sup>®12</sup> 0,5% (Kanoldt Arzneimittel, Ismaning, D) verglichen. Da in letzterem PIN 0,5%ig vorliegt, erfolgte eine Verdünnung mit GBR pH 7,4 auf 0,15% PIN.

Für die Permeationsversuche mit den SEGRA ZK 216771 und ZK 247756 wurden die unter Material und Methoden, VI.2.7.1/VI.2.7.2, beschriebenen Formulierungen verwendet. Für ZK 216771 und ZK 247756 wurde eine Akzeptorlösung von SPP pH 7,0 verwendet.

#### VI.2.4.4.2. Cyclodextrinlösungen

Zur Membranpermeabilität von CDe wurden die jeweiligen CDe ( $\alpha$ -CD: 3,7%ig, HP- $\alpha/\beta/\gamma$ -CD: 12,5%) direkt in einen 10 ml Maßkolben eingewogen, mit GBR pH 7,4 aufgefüllt und solange gerührt (Magnetrührer), bis eine vollkommen klare Lösung entstand.

### VI.2.5. *Wirkstoffpenetration in isolierte Schweinecornea*

Je Einzelversuch wurden 3 Corneae (gewogen, Einwaage als Feuchtgewicht) von frisch geschlachteten Schweinen in 5 ml einer Arzneistoffformulierung (0,25%ige ZK 247756-Mikroemulsion (ME-CD-SEGRA), Ergebnisse und Diskussion, V.3.1.1, Tabelle 32) 30, 60 und 120 min eingelegt und bei Raumtemperatur gerührt (Magnetrührer). Daraufhin wurden die Corneae mehrfach mit isotonem SPP pH 7,4 abgespült und mit Hilfe einer chirurgischen Schere so klein wie möglich geschnitten, in jeweils vorher tarierte Eppendorfgefäße überführt und mit 500  $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert.

Eine weitere Zerkleinerung (ca. 5 min) des Materials erfolgte unter Eiswasserkühlung mittels Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD 70, Gerätetyp UW 70, Netzspannung 220-240 V, Cycle 70, Power kleiner MS 72/D; Bandelin electronic, Berlin, D). Für die anschließende Zentrifugation (Zentrifuge: Hermle ZK 380, Gosheim, D) bei 12000 U/min (ca. 15 min) zur Abtrennung des Extraktionsmittels vom Gewebe, wurden die Eppendorfgefäße mit den Corneae in toto in die Zentrifugengläser überführt. Der Überstand wurde abpipettiert und der Arzneistoffgehalt durch HPLC (VI.2.2.4) quantitativ bestimmt.

---

<sup>12</sup>Pindoptan<sup>®</sup>: 1 ml Lösung enthält: 5,0 mg Pindolol; Benzalkoniumchlorid (als Konservierungsmittel) 0,1 mg, Edetinsäure-Dinatriumsalz, Natriumchlorid, Natriumhydroxid und Salzsäure zur pH-Einstellung, Wasser für Injektionszwecke (gemessener pH-Wert: 6,6-6,7)

## VI.2.6. Verteilung von Mycophenolatmofetil am Kaninchenauge

### VI.2.6.1. Testlösungen

Die am Kaninchenauge getesteten Lösungen bzw. Suspensionen (Tabelle 35) wurden kurz vor der Anwendung unter aseptischen Bedingungen („Laminar-airflow“) hergestellt. Die Feststoffe MMF, MPA, HP- $\beta$ -CD und Natriumchlorid (NaCl) wurden direkt in ein strahlensterilisiertes Augentropfen-gefäß eingewogen. Dann wurde mit sterilfiltriertem (Sterilfilter: 0,22  $\mu$ m, Celluloseacetat) SPP pH 7,4 (Lösungsmittel: Wasser für Injektionszwecke) aufgefüllt. Die zunächst entstandenen Suspensionen wurden unter Standardbedingungen autoklaviert (121°C,  $2 \cdot 10^5$  Pa, 15 min), wodurch eine vollständige Auflösung von MMF bzw. MPA in den HP- $\beta$ -CD-haltigen Formulierungen erfolgte. Gleichzeitig konnte hierdurch die nach dem Europäischen Arzneibuch [54] geforderte Sterilität der ophthalmologischen Zubereitungen erzielt werden.

Wie bereits unter, V.2, erwähnt, führte der Autoklavierungsprozess zu einer Teilhydrolyse des Prodrugs MMF zu MPA. So enthielt die frisch hergestellte MMF/CD-Lösung nach Autoklavierung  $48,50 \pm 5,48$  % MPA; die MMF-Suspension dagegen  $10,35 \pm 1,35$  % MPA.

Die MPA/CD-Lösung blieb nach Autoklavierung 100%ig stabil, d.h. es konnten durch HPLC keine Abbauprodukte der MPA erkannt werden. Die Konzentrationen an MMF bzw. an MPA in den autoklavierten Lösungen (MMF/CD; MMF/SP) waren bei Lagerung im Kühlschrank mindestens 2 Wochen konstant. Die für die *In-vivo*-Versuche verwendeten MMF/MPA-Lösungen (Tabelle 35) wurden am Versuchstag oder am Tag zuvor hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

Die MMF-Suspension (MMF/SP) wurde ohne Viskositätserhöher oder andere Hilfsstoffe zur Verbesserung ihrer physikalischen Stabilität, der Aufschüttelbarkeit des Sediments und/oder zur verbesserten Dosierungsgenauigkeit hergestellt, um den Vergleich zur MMF/CD-Lösung zu gewährleisten. Demzufolge war es notwendig, die Suspension unmittelbar vor der Applikation am Kaninchenauge zur gleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffs 10 min in ein Ultraschallbad zu stellen. Die applizierte MMF/SP wies gemäß der im Europäischen Arzneibuch geforderten Teilchengröße eine Partikelgröße von  $< 25$   $\mu$ m (Mikroskop) auf. Die Einstellung der Tonizität erfolgte mit NaCl. Der osmotische Druck (Knauer Osmometer, Berlin, D) wurde zu 311-324 mOsmol/kg bestimmt, so dass die Lösungen schwach hyperton



waren. Zur *In-vivo*-Testung gelangten die in Tabelle 35 aufgeführten Formulierungen:

**Tabelle 35: Rezepturen für okulare MMF/MPA-Formulierungen**

	Einwaage [g]		
	MMF/CD	MMF/SP	MPA/CD
Mycophenolatmofetil	0,1 <sup>1</sup>	0,1 <sup>1</sup>	-
Mycophenolsäure	-	-	0,1
Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin	1,0	-	1,0
Natriumchlorid	0,030	0,068	0,030
Sørensen Phosphatpuffer pH 7.4 ad	10,0	10,0	10,0

CD: Lösung, die 10% Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin enthält, SP: Suspension  
 10,10 g MMF ( $M_r$ : 433,50) entspricht 0,074 g MPA ( $M_r$  = 320,35)

#### VI.2.6.2. Tierversuche (Kaninchen)

Die tierexperimentellen Versuche am Kaninchen wurden ordnungsgemäß beantragt und von der zuständigen Behörde des Landes Berlins genehmigt.

Es wurden insgesamt 32 Kaninchen (pigmentierte Chinchilla Bastard, 4-6 Wochen alt; 3,0-3,5 kg, Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg/Sulzfeld, D) verwendet. Die Tierhaltung entsprach den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes (12h-Tag/Nacht-Rhythmus, freier Zugang zu Wasser und Futter etc.). Die Tierversuche wurden entsprechend den Vorgaben der ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) durchgeführt.

Eine „loading dose“ von 5 x 50  $\mu$ l der jeweiligen Augentropfenformulierung (MMF/SP, MMF/CD, MPA/CD) wurde in einminütigen Abständen in den Bindehautsack des jeweils rechten Auges appliziert und anschließend leicht einmassiert. Das linke Auge des Versuchstiers diente als Kontrolle und wurde in der gleichen Weise exzidiert und aufgearbeitet. Für die Formulierungen MMF/CD und MMF/SP wurden Gewebeproben nach 30, 60 und 240 min entnommen, für die Formulierung MPA/CD nach 30 und 60 min. Pro Kontrollzeit wurden vier Kaninchen eingesetzt.

Die Kaninchen wurden i.m. mit Rompun® 2% (Bayer, Leverkusen, D; Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid) in Vollnarkose versetzt und nach 30, 60 bzw. 240 min mit einer intrakardialen

Injektion von Kaliumchlorid getötet. Unmittelbar danach wurden ca. 5 ml Serum entnommen. Das Kammerwasser beider Augen (jeweils ca. 200 µl) wurde durch Vorderkammerpunktion mit einer Insulinspritze aufgezogen. Danach erfolgte das Herauspräparieren der Conjunctiva und Cornea mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette bzw. Schere. Der Glaskörper wurde mit einer 2 ml-Spritze aufgezogen; der Iris-Ziliarkörper mit einer Pinzette isoliert. Zuletzt wurde die Sclera vollständig herauspräpariert und mittels Rasierklinge oder Skalpell auf einem Objektträger von Resten benachbarter Gewebe befreit.

Das Blut wurde sofort zentrifugiert und so von seinen festen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und in Plastikröhrchen überführt. Die okularen Gewebeflüssigkeiten (Kammerwasser, Glaskörper) und festen Gewebe (Cornea, Sclera, Iris-Ziliarkörper, Conjunctiva) wurden in tarierte Eppendorfgefäße überführt und zur Ermittlung ihres Feuchtgewichts gewogen (Analysenwaage Sartorius). Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden alle Proben bei -84° C tiefgefroren (GFL 6380-Gefriertruhe, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D).

#### VI.2.6.3. Gewebeaufarbeitung

Die Aufarbeitung der okularen Gewebe erfolgte in Anlehnung an [207], teilweise modifiziert bzw. weiterentwickelt. Es standen 4 Kaninchen für Vorversuche zur Verfügung.

##### VI.2.6.3.1. Kammerwasser

Die Gehaltsbestimmung von MMF und MPA in den Kammerwasserproben erfolgte ohne weitere Aufarbeitung direkt mittels HPLC (VI.2.2.3).

##### VI.2.6.3.2. Cornea / Sclera

Cornea bzw. Sclera wurden mit Hilfe einer chirurgischen Schere (Aesculap BC 100) in sehr kleine Teile geschnitten, in 1000 µl einer Mischung von SPP pH 7,4 und DMSO (3+7) aufgenommen und mit einem Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD 70, Gerätetyp UW 70, Netzspannung 220-240 V, Cycle 70, Power kleiner MS 72/D; Bandelin electronic, Berlin, D) direkt im Eppendorfgefäß unter Eiswasserkühlung homogenisiert. Danach wurden die Eppendorfgefäße 15 min in Zentrifugengläsern bei 12000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge: Hermle ZK 380, Gosheim, D). Der Überstand wurde abpipettiert und der Wirkstoffgehalt direkt durch HPLC quantitativ bestimmt.

#### VI.2.6.3.3. Conjunctiva / Iris-Ziliarkörper

1000 µl der Mischung (3+7) von SPP pH 7,4 und DMSO wurden jeder Gewebeprobe von Conjunctiva bzw. Iris-Ziliarkörper zugesetzt und mit Hilfe des Ultraschallstabs unter Eiswasserkühlung homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu VI.2.6.3.2 (Cornea/Sclera).

#### VI.2.6.3.4. Glaskörper / Plasma

1000/3000 µl Tertiär-butyl-methyl-ether (TBME) wurden 500/1000 µl Glaskörper/Plasma zugesetzt und 1 h mittels Magnetrührer gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend abgetrennt und durch vorsichtiges Erhitzen (elektrische Heizplatte) unter Rühren abgedampft. Der Extraktionsvorgang mit TBME wurde mindestens einmal wiederholt. Der Rückstand wurde in SPP pH 7,4 aufgenommen und der HPLC zugeführt.

### *VI.2.7. Herstellung okularer Formulierungen von ZK 216771 / 247756*

#### VI.2.7.1. ZK 216771

Die für ZK 216771 entwickelte Rezeptur (Ergebnisse und Diskussion, V.3.1.1, Tabelle 27) wurde wie folgt hergestellt:

ZK 216771 wurde im Verhältnis 1:8 unter Rühren (Magnetrührer) bis zum vollständigen Auflösen in Ethanol gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 40 Teilen HP-γ-CD unter mindestens 10minütigem Rühren. Die Wassermenge (352 Teile) wurde in Anteilen nach und nach zugesetzt. Die so entstandene Lösung wies einen pH von 6,3 auf. Die Stabilität wurde nach 5 Wochen (Lagerung im Kühlschrank) bestimmt, der Gehalt betrug 91,6%.

#### VI.2.7.2. ZK 247756

Im Rahmen der Rezepturentwicklung für ZK 247756-Rezeptur (Ergebnisse und Diskussion, V.3.2.1) wurden die in Tabelle 36 aufgeführten Gemischten Mizellen auf ihre Eignung geprüft.

Die Herstellung der Mikroemulsion (ME, Ergebnisse und Diskussion, V.3.2.1, Tabelle 30) erfolgte, indem Rizinusöl, Cremophor® RH 40 und Macrogol in ein tariertes Becherglas eingewogen wurden und unter Erwärmen zuerst mit einem Glasstab manuell, dann mit einem

Magnetrührer gerührt wurden. Sobald die Bestandteile homogen vermischt waren, wurde das Wasser in Anteilen (unter Rühren, Erwärmen auf ca. 50°C) zugegeben. Die entstandene Mikroemulsion (ME-CD) wurde unter Druck sterilfiltriert (150 ml-EASY FLOW™-Filter, 0,22 µm Celluloseacetatmembran, Becton Dickson Labware, Franklin Lakes, NJ., USA) und in sterilen Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

**Tabelle 36: Zusammensetzung der Gemischten Mizellen; nach [182]**

Hilfsstoffe	Einwaage
Lipoid® S100	90.0 mg
Glykocholsäure	54.2 mg
Mannitol	36.0 mg
Natriumedetat · 2 H <sub>2</sub> O	0.2 mg
0.1N NaOH	ad pH 6.5
Wasser für Injektionszwecke	ad 1.0 ml

Die SEGRA-haltige Mikroemulsion (ME-CD-SEGRA) zur okularen Anwendung (Ergebnisse und Diskussion, V.3.2.1, Tabelle 32) wurde wie folgt hergestellt:

ZK 247756 und HP-γ-CD wurden mit ca. 2-3 g der sterilen Mikroemulsion ME-CD zuerst 5 min bei RT auf einer niedrigen Stufe mittels Magnetrührer gerührt. Danach wurde die restliche Mikroemulsion in Anteilen zugegeben, die Rührgeschwindigkeit langsam erhöht und schließlich auf Höchststufe ca. 30 min weitergerührt, bis eine klare Zubereitung entstand und makroskopisch keine Teilchen von ZK 247756 mehr zu erkennen waren. Zuletzt wurde die fertige Formulierung in ein strahlensterilisiertes Augentropfengefäß (Firma Remy&Geiser, Anhausen, D) direkt steril filtriert (Sterilfilter: 0,22 µm, Celluloseacetat).

### VI.2.7.3. Keratoplastik

#### VI.2.7.3.1. Tiere

Die Keratoplastik wurde an 18 weiblichen Lewis (LEW)-Ratten (Charles River, Kisslegg, D) durchgeführt. Das Gewicht der Ratten betrug 200-250g und der Hornhautdurchmesser durchschnittlich 3,5 mm. Diese Tiere erhielten Transplantate von HLA-Klasse I/II-inkompatiblen DA-Spendertieren. Diese Stämme unterscheiden sich grundlegend in ihrem MHC (Major histocompatibility complex), d.h. die immunologische Barriere ist hoch.

Alle Tiere wurden mit Standardlaborfutter ernährt und hatten freien Zugang zu Leitungswasser.

Die Tiere wurden im Einklang mit den Vorschriften („Guide for the Care and Use of Laboratory animals“) des National Institute of Health (USA) und den Richtlinien der Berliner Senatsverwaltung (D) für die Tierhaltung zu Forschungszwecken gehalten.

#### VI.2.7.3.2. Tiermodell

Die Spendertiere wurden unter Narkose durch eine Überdosis Pentobarbital (Narcoren<sup>TM</sup>, Rhone Merieux, Laupheim, D) getötet. Vor dem chirurgischen Eingriff wurden die Pupillen der Spenderaugen durch 1%ige Atropinsulfataugentropfen (Ciba Vision, Wefling, D) geweitet. Die Pupillenweitung wurde durchgeführt, um eine durch die chirurgische Intervention induzierte Schädigung der Iris sowie Fibrinschleier (Synechien) bei flacher Vorderkammer zu vermeiden. 0,05 ml einer Lösung, die 1 mg/ml Epinephrin enthielt, wurde subconjunctival injiziert, um eine maximale Weitung der Iris aufrecht zu erhalten.

#### VI.2.7.3.3. Chirurgie

Die Cornea (3,5 mm) des Spendertiers wurde mit Hilfe eines Trepans, gebogenen Castroviejo-Scheren und eines Operationsmikroskops unter sterilen Bedingungen auf einem sterilen Tropfen 1%iger Methylcelluloselösung auf das Empfängertier übertragen. Die Narkose für das Empfängertier erfolgte durch eine Narcoren<sup>TM</sup>-Injektion (2,5-5,0 mg/kg).

Beim Eröffnen der Vorderkammer wurde eine viskoelastische Substanz (Healon<sup>TM</sup>, Pharmacia, Erlangen, D) instilliert, um die Form der Vorderkammer wiederherzustellen und eine Schädigung von Linse oder Iris zu vermeiden. Nach Wundverschluss wurde die optimale Adaptation der Wundränder mit einer feinen Kanüle oder Pinzette kontrolliert, die Vorderkammer wurde durch die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung vertieft.

Eine antibiotische Augensalbe (Ofloxacin, Floxal<sup>TM</sup>, Dr. Mann Pharma GmbH, Berlin, D) wurde sofort nach der Hornhauttransplantation sowie in den folgenden Wochen appliziert. Mit der nichttransplantierten Kontrollgruppe wurde analog verfahren.

#### VI.2.7.3.4. Topische Behandlung der Ratten

42 Tiere wurden einer orthotopen<sup>13</sup> Hornhauttransplantation unterzogen. Syngene<sup>14</sup> Transplantate in 12 LEW-Empfängertieren dienten als Kontrolle für eventuell auftretende technische Probleme (Tabelle 37).

Allogene<sup>15</sup> Transplantate in 18 LEW-Empfängertieren, die DA-Transplantate erhielten, wurden randomisiert einer topischen Behandlung nach Tabelle 37 unterzogen.

**Tabelle 37: Versuchsgruppen bei lokaler Therapie mit ZK 247756 nach Keratoplastik**

Gruppe	Augentropfen	Arzneistoffe/Hilfsstoffe	Anzahl (n)
Syngene Transplantate			
1	keine Therapie		12
Allogene Transplantate			
2	keine Therapie		6
3	ME-CD1	wirkstofffreies Vehikel	6
4	ME-CD-SEGRA	0,25% ZK 247756 in ME-CD1	6

<sup>1</sup>ME-CD: Mikroemulsion mit HP- $\gamma$ -CD

Die Behandlung wurde am Tag der Transplantation mit einer „loading-dose“ von 5 x 20  $\mu$ l begonnen. Daraufhin erfolgte 5 x täglich über einen Zeitraum von 35 Tagen die Applikation von 20  $\mu$ l der ZK 247756-Augentropfen (Gruppe 4, Tabelle 37) in den rechten Bindehautsack.

#### VI.2.7.3.5. Beurteilung der Transplantate

Die Beurteilung der Transplantate erfolgte nach etablierten Beurteilungskriterien, basierend auf Hornhauttrübung und Hornhautödem [159, 164]. Die Transplantate wurden dreimal

---

<sup>13</sup>Orthotope Transplantation: Das transplantierte Organ wird anstelle des entfernten eigenen Organs implantiert.

<sup>14</sup>Syngen: Transplantation zwischen genetisch identischen Individuen (eineieiige Zwillinge, Inzuchtstämme verschiedener Tiere)

<sup>15</sup>Allogen: Transplantation zwischen Individuen der gleichen Spezies (Artgleichheit) [251]

täglich innerhalb der ersten postoperativen Woche unter einem Operationsmikroskop untersucht, danach bis zum Versuchsende einmal am Tag.

Transplantate wurden auf einer Skala von 0-4 hinsichtlich Durchsichtigkeit/Undurchsichtigkeit bzw. Ödemen bewertet. Die Evaluierung der cornealen Klarheit erfolgte folgendermaßen: 0 = klares Transplantat; 1 = leicht trüb; 2 = zunehmende Trübung (deutlich sichtbare Irisstruktur); 3 = Trübung (Vorderkammerstrukturen schlecht sichtbar); 4 = trübes, undurchsichtiges Transplantat (Vorderkammerstrukturen nicht mehr sichtbar). Ödeme wurden nach folgenden Kriterien eingestuft: 0 = kein Ödem; 1 = leichte stromale Schwellung des Transplantats; 2 = diffuses stromales Ödem; 3 = diffuses stromales und epitheliales Ödem; 4 = bullöse Keratopathie. Ein „Abstoßungswert“ [159], basierend auf der Summe der einzelnen Beurteilungskriterien, wurde an jedem postoperativen Tag berechnet. Corneale Transplantate wurden als „abgestoßen“ eingestuft, sobald moderate bzw. schwerwiegende Veränderungen (s.o.) auftraten.

#### VI.2.7.3.6. Bestimmung der immunologischen Parameter

Um das Cytokinmuster im cornealen Transplantat zu bestimmen, wurde an 12 zusätzlichen Ratten eine Keratoplastik durchgeführt. Am 7. postoperativen Tag wurden die Transplantate herauspräpariert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraufhin erfolgte die Isolierung der RNA und die Analyse der mRNA-Expression durch „real-time-polymerase-chain-reaction“ (RT-PCR, Polymerase-Kettenreaktion) (ABI Prism 7700 Sequence Detection System „Taqman“; PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Die mRNA jedes einzelnen Transplantats wurde in cDNA transkribiert und letztere dann mittels RT-PCR auf Cytokingenexpression untersucht.

#### VI.2.8. *Raster-Elektronenmikroskopie (REM)*<sup>16</sup>

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht zwar wesentlich höhere Auflösungen als die Lichtmikroskopie, erfordert aber das Arbeiten im Vakuum und einen größeren Aufwand bei

---

<sup>16</sup>An dieser Stelle danke ich Frau A. Säger, Augenklinik, Charité Virchow-Klinikum, für die freundliche Unterstützung bei der Vorbereitung der REM-Proben bzw. der Anfertigung von REM-Aufnahmen sowie deren Auswertung.

der Probenpräparation, da viele biologische Proben unbehandelt zu kontrastschwachen Bildern führen [228].

Das Material für die REM sollte eine hohe Vakuumbeständigkeit haben, sich unter Elektronenbeschuss nicht verändern, keine störenden Aufladungen besitzen und über eine saubere Oberfläche verfügen [228].

Es ist entscheidend, dass die Probe während der Präparation möglichst wenig beschädigt wird, weil sonst Präparationsartefakte auftreten können, die vom Betrachter als natürliche Strukturen fehlgedeutet werden können [228].

Um Untersuchungen über die corneale Verträglichkeit verschiedener Präparate durchzuführen, wurden die einzelnen Proben wie folgt gewonnen:

Aus den Schweineaugen<sup>E</sup> frisch geschlachteter Tiere wurden die Corneae etwa 2-3 h nach der Schlachtung herauspräpariert (s. VI.2.4.1) und 30 min einzeln in jeweils 5 ml CD-Lösung (1,85/ 3,7/ 10,0  $\alpha$ -CD; 4,7/ 11,7% HP- $\alpha$ -CD; 12,5% HP- $\beta$ -CD) eingelegt.

Anschließend wurden die Corneae in 2,5%igem phosphatgepuffertem (SPP pH 7,4) Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg, D) über Nacht fixiert. Glutaraldehyd ist für die Vernetzung der Proteine im Gewebe verantwortlich und stabilisiert so die Hornhäute. Anschließend wurden die Gewebe in 2%igem Osmiumtetroxid (Paesel und Lorei GmbH & Co., Hanau, D) gewaschen und nachfixiert. Dieses Reagenz reagiert mit Doppelbindungen und vernetzt z.B. die Phospholipide von Membranen, wobei es selbst reduziert wird und dadurch das Gewebe schwarz bis schwarzbraun färbt. Auf diese Weise wirkt es gleichzeitig als Stabilisierungs- und Kontrastmittel. Nach dem Auswaschen mit Wasser erfolgte eine Entwässerung mit einer Alkoholreihe aus 30, 50, 70, 80, 90 und 96%igem Ethanol (BfB, Offenbach am Main, D). Jeder Schritt dauerte 10 min. Bei der Entwässerung wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht mit Luft in Berührung kamen.

Der Alkohol wurde mit Hexamethyldisilazan (HMDS, Sigma, Steinheim, D) vollständig entfernt und somit gleichzeitig eine oberflächenspannungsfreie Trocknung vorbereitet.

Das Trocknen (Lufttrocknung) bzw. der Phasenübergang des Wassers von flüssig nach gasförmig, ist der kritischste Schritt der Aufarbeitung. Aufgrund der hohen Oberflächenspannung entstehen hierbei leicht Schäden an den Proben, weshalb diese zuvor mit HMDS



entwässert wurden. Dann wurden die luftgetrockneten Proben auf einen Präparatehalter aufgebracht und mit Gold „besputtet“ (Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED 020, BAL-TEC, Schalksmühle, D).

Da biologische Materialien eine sehr geringe Leitfähigkeit und eine extrem niedrige Sekundärelektronendichte haben, muss eine möglichst dünne Metallschicht auf die Probe gebracht werden, um möglichst genaue Informationen über das Material zu erhalten. Das Besputtern ist ein spezielles Verfahren, um die Präparate möglichst gleichmäßig mit Gold zu beschichten. Dabei wird eine Goldelektrode mit Ionen beschossen, und feinste Partikel werden auf das Präparat gebracht. Die so vorbereitete Probe wurde in einem Rasterelektronenmikroskop (DSM 982, Gemini, Zeiss, D) bei geeigneten Vergrößerungen betrachtet und fotografiert.

### *VI.2.9. Statistik*

Die tabellierten Werte bzw. die Punkte oder Balken in den Abbildungen geben die Mittelwerte wieder; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar, wobei ein bestimmter Stichprobenumfang (n) zugrunde gelegt wird [50]. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten einzelner Versuchsreihen wurde mittels zweiseitigem t-Test nach Student oder einem ANOVA-Test bestimmt [66].

#### *VI.2.9.1. Betarezeptorenblocker / Mycophenolatmofetil*

Um die Varianzen zweier Gruppen zu vergleichen, wurde zunächst ein F-Test durchgeführt. Mit dem F-Test konnte eine Varianzenhomogenität oder eine Varianzeninhomogenität angenommen werden. Abhängig von diesen Ergebnissen wurde ein zweiseitiger t-Test für homogene bzw. inhomogene Varianzen durchgeführt. Signifikanzen wurden für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) bestimmt [66].

Ein einfaktorieller (Single-Factor-) ANOVA (Analysis of variance = Varianzanalyse)-Test wurde teilweise zusätzlich durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Mittelwerte von zwei oder mehreren Proben als gleichwertig zu betrachten sind. Diese Methode stellt eine Erweiterung der Tests dar, die nur zwei Mittelwerte vergleichen, wie z.B. der t-Test. ANOVA vergleicht die Mittelwerte zwischen verschiedenen Gruppen und innerhalb der einzelnen Gruppen.

Signifikanzen wurden für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) bestimmt.

Ein zweifaktorieller (Two-factor-) ANOVA-Test entspricht dem einfaktoriellen mit einer zusätzlichen Variablen. Dieser Test ist in der Lage, 3 Effekte aufzuzeigen, wohingegen der einfaktorielle ANOVA-Test nur einen Effekt aufzeigt.

Es wurde die Statistik-Software von Microsoft Excel verwendet.

#### VI.2.9.2. SEGRA (Keratoplastik)

Transplantatüberlebenszeiten wurden mit Hilfe einer „Mantel Haenszel-Analyse [135] verglichen. Jedes hornhauttransplantierte Tier wurde in die Auswertung mit einbezogen. Tiere, die vorzeitig starben bzw. eine Komplikation entwickelten, konnten nicht in die Statistik einbezogen werden.

Zusätzlich wurden die Überlebenszeiten der Rattentransplantate durch einen einfaktoriellen ANOVA-Test (VI.2.9.1) verglichen. Die Analyse der RT-PCR-Daten erfolgte mittels eines Mann-Whitney-u-Tests [50] (Test bei nicht normalverteilten Werten).

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Cyclodextrine (CDe) als Hilfsstoffe zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit lipophiler Arzneistoffe und/oder zur Modulation der okularen Arzneistofffreisetzung spielen eine zunehmend wichtige Rolle bei der Formulierungsentwicklung von Ophthalmika.

Anliegen dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses ausgewählter CDe bzw. CD-Derivate auf die okulare Arzneistoffverfügbarkeit verschiedener lipophiler und hydrophiler Antiglaukomatosa und Immunsuppressiva *in vitro* (Schwein) und/oder *in vivo* (Kaninchen, Ratte).

### Betarezeptorenblocker

Die Permeationsparameter der gut wasserlöslichen Betablockersalze (Betaxololhydrochlorid, Metoprololtartrat, Mepindololsulfat (MEP)) differierten untereinander nicht signifikant. Im Gegensatz dazu permeierten Alprenololhydrochlorid und Oxprenololhydrochlorid in einem wesentlich geringeren Ausmaß (signifikanter Unterschied der Permeationskoeffizienten  $P_{\text{eff}}$  bzw. der  $Q_{300}$ -Werte verglichen mit Betaxolol, Metoprolol, Mepindolol) bei Auftreten einer 120minütigen „lag time“. Eine eindeutige Erklärung für diesen Befund bleibt offen. Diskutiert werden intra- und intermolekulare Wechselwirkungen des betreffenden Wirkstoffs.

Die Permeation des Betablockers Mepindololsulfat (MEP; 0,5% – bezogen auf die Base) aus  $\alpha$ -CDhaltigen wässrigen Pufferlösungen abgestufter Konzentration ergab eine signifikante Steigerung des  $P_{\text{eff}}$  bei Zugabe von 3,7 sowie 10%  $\alpha$ -CD. In Anwesenheit von HP- $\alpha$ -CD unterschiedlicher Konzentration veränderte sich der  $P_{\text{eff}}$  dagegen nicht signifikant und zeigte auch keine tendenzielle Konzentrationsabhängigkeit. Vorbehandlung der Membranen mit  $\alpha$ -CD bzw. HP- $\alpha$ -CD und anschließende MEP-Permeation aus Pufferlösungen führte für  $\alpha$ -CD zu einer signifikanten Erhöhung des  $P_{\text{eff}}$ . Aufgrund dieses Resultats kann davon ausgegangen werden, dass die durch  $\alpha$ -CD hervorgerufenen Permeabilitätssteigerungen vorwiegend auf Veränderungen im cornealen Gewebe zurückzuführen sind. Die Permeation von  $\alpha$ -CD (3,7%) selbst zeigte eine Zunahme des permeierten Anteils mit der Zeit. Es wurde allerdings lediglich ein kumulativer Endwert (nach 5 h) von 0,36% erreicht.

Vergleichende Permeationsstudien mit Corneae unterschiedlicher Herkunft (Schweinecornea<sup>E</sup> bzw. <sup>T</sup>) wurden für MEP allein sowie in Gegenwart von 3,7%  $\alpha$ -CD und 12,5% HP- $\beta/\gamma$ -CD

durchgeführt. Der  $P_{\text{eff}}$  für MEP aus Pufferlösung (Referenz) war bei Verwendung von Schweinecornea<sup>T</sup> signifikant auf den doppelten Wert des  $P_{\text{eff}}$ , der an der im Vorwege mehr gestressten Schweinecornea<sup>E</sup> erzielt wurde, erhöht. Auf die jeweilige CD-freie Referenz bezogen, nahm der  $P_{\text{eff}}$  von MEP an beiden Membranen bei Zusatz von HP- $\gamma$ -CD auf ca. die Hälfte ab und bei Zusatz von  $\alpha$ -CD etwa 2,5fach zu.

Zu differierenden Resultaten an den beiden Corneae führte demgegenüber der HP- $\beta$ -CD-Zusatz. Während bei Verwendung von Schweinecornea<sup>E</sup> eine signifikante Permeationszunahme für MEP gegenüber der Referenz sowie eine „lag time“ ermittelt wurden, resultierte bei Verwendung von Schweinecornea<sup>T</sup> eine nicht signifikante Permeationsabnahme. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein absoluter Vergleich der Permeabilität nur innerhalb des gleichen Membranausgangsmaterials zulässig ist.

Hydroxypropyliertes  $\alpha/\beta/\gamma$ -CD änderte den  $P_{\text{eff}}$  von Pilocarpinhydrochlorid (P) bei Verwendung von Schweinecornea<sup>E</sup> nicht signifikant. Entsprechende Versuche mit Schweinecornea<sup>T</sup> führten allerdings zu einer signifikanten Abnahme bei Zusatz von HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD.

In einer CD-freien Kombination des P mit MEP verdoppelte sich der  $P \cdot P_{\text{eff}}$ . Wurden dieser Wirkstoffkombination HP- $\beta$ -CD bzw. HP- $\gamma$ -CD zugefügt, konnte sowohl für P als auch für MEP eine  $P_{\text{eff}}$ -Reduzierung gegenüber der Referenz erfasst werden. HP- $\alpha$ -CD zeigte keinen statistisch gesicherten Effekt. Die nach 300 min kumulativ freigesetzte MEP- bzw. P-Konzentration ( $Q_{300}$ ) ergab dagegen generell eine signifikante Abnahme in Anwesenheit der drei hydroxypropylierten CD-Derivate gegenüber der P/MEP-Kombination. Aufgrund der Ergebnisse sind sowohl Arzneistoff-/Arzneistoff- bzw. Arzneistoff-/CD-Interaktionen zu diskutieren.

Es ist anzunehmen, dass bei Anwendung *in vivo* durch die Kombination der zwei Arzneistoffe sowie durch Einsatz der hydroxypropylierten CDe relevante Auswirkungen auf die okuläre Verfügbarkeit resultieren. Wie in der Literatur über klinische Studien mit Betablocker-Kombinationen berichtet [56], ist ggf. auch bei Anwendung von MEP in Kombination mit P eine Wirkungssteigerung zu erzielen, die darüber hinaus modifizierbar wird. CDe könnten außerdem den Tränenfilm, der durch Betablocker bekanntermaßen gestört wird, stabilisieren und damit Irritationen und Nebenwirkungen reduzieren. Entsprechende *In-vivo*-

Untersuchungen am Menschen sind allerdings die Voraussetzung zur Bestätigung der erzielten *In-vitro*-Befunde und aufgestellten Hypothesen.

### **Mycophenolatmofetil**

Für das schwerlösliche Esterprodrug Mycophenolatmofetil (MMF), das bisher ausschließlich systemisch als Immunsuppressivum in der Ophthalmologie zur Anwendung gelangte, wurden mit 10% HP- $\beta$ -CD wässrige Augentropfen zur topischen Applikation entwickelt [202]. In der vorliegenden Arbeit erfolgten *In-vivo*-Versuche zur Wirkstoffverteilung am Kaninchenauge mit 1%iger MMF/CD-Lösung, die aufgrund des erforderlichen Herstellungsverfahrens (Autoklavierung) 51,5% MMF und 48,5% der wirksamen Elternverbindung Mycophenolsäure (MPA) enthielt. Vergleichend erfolgte die Untersuchung zu einer 1%igen MMF-Suspension (MMF/SP), die 89,7% MMF und 10,4% MPA enthielt. Es wurde die intraokulare Verteilung von MMF bzw. MPA in Conjunctiva, Cornea, Sclera, Iris-Ziliarkörper, Glaskörper, Kammerwasser sowie im Plasma nach 30, 60 und 240 min bestimmt.

In Cornea und Kammerwasser war das Prodrug MMF zu keinem Zeitpunkt nachzuweisen, weder nach Applikation von MMF/SP, noch von MMF/CD. Dagegen ließen sich nach Anwendung von MMF/SP noch Minimalkonzentrationen von MMF in Conjunctiva, Sclera und Iris-Ziliarkörper erfassen. Insgesamt ist davon auszugehen, dass MMF rasch durch in erster Linie im Epithel lokalisierten Esterasen in MPA und den Morpholinorest gespalten wird, so dass die aktive Komponente optimal zur Verfügung steht.

Das relativ schnelle (nach 30 min) Anfluten hoher Konzentrationen von MPA aus beiden Präparationen in Cornea und Kammerwasser lässt bevorzugt auf den cornealen Absorptionsweg schließen. Dagegen wurde nach Gabe der MMF/SP in der Conjunctiva zum Zeitpunkt 30 min ein signifikant höherer MPA-Wert detektiert, was auch für einen zumindest partiellen conjunctivalen Transport spricht. Nach 60 min war die Kammerwasserkonzentration von MPA nach MMF/CD-Applikation signifikant (4,3 mal) höher als bei MMF/SP. Auch die Gewebekonzentrationen in Cornea, Sclera und Conjunctiva zeigten sich für MMF/CD nach 60 min signifikant höher.

Da MPA den eigentlichen Wirkstoff darstellt, wurde darüber hinaus eine MPA/CD-Lösung (MPA/CD; 1% MPA, 10% HP- $\gamma$ -CD) vergleichend zu MMF/CD überprüft. Der Vorteil dieser Zubereitung liegt in ihrer Gehaltsstabilität. Jedoch erwies sich MPA/CD bezüglich seiner

Wirkstoffverteilung am Kaninchenauge den beiden anderen getesteten Präparationen gegenüber als unterlegen. Nach 30 min erreichte MPA/CD lediglich ca. 25% der Kammerwasserkonzentration von MMF/SP bzw. MMF/CD. Im Gegensatz dazu waren die Plasmaspiegel für MPA/CD nach 30 min höher als bei MMF/CD, was verstärkte systemische Nebenwirkungen erwarten lässt.

Die vorliegenden Resultate berechtigen zu der Hoffnung, MMF in Form wässriger Augentropfen auf Basis des okular gut verträglichen hydroxypropylierten  $\beta$ -CDs erfolgreich zur topischen Anwendung zu bringen, wobei eine weitere Rezepturoptimierung im Hinblick auf die Wirkstoffstabilität sowie entsprechende klinische Untersuchungen Voraussetzung sind.

### **Selektive Glucocorticoidrezeptoragonisten**

Einen weiteren Teil dieser Arbeit stellt die Formulierungsentwicklung von zwei neuen, sehr schwer löslichen selektiven Glucocorticoidrezeptoragonisten (SEGRA: ZK 216771 und ZK 247756) dar. SEGRA weisen im Vergleich zu Glucocorticoiden ein günstigeres Nebenwirkungsprofil auf, was auch für die lokale Therapie in der Ophthalmologie einen zusätzlich positiven Effekt haben könnte.

Im Hinblick auf die vorgesehenen *In-vivo*-Versuche wurde eine okular anwendbare Formulierung mit einem Gehalt von 0,12 bis 1% SEGRA angestrebt. Zur Löslichkeitsvermittlung wurden bevorzugt CDe (HP- $\beta$ -CD und HP- $\gamma$ -CD) erprobt. Durch einen optimierten Herstellungsprozess gelang es, 0,25% ZK 216771 mit 10% HP- $\gamma$ -CD unter Anwesenheit von 2% Ethanol in Lösung zu bringen.

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge konnten lediglich 10 ml Lösung hergestellt werden. Durch ein Scaling-Up müsste das Herstellungsverfahren auf seine Anwendbarkeit für größere Mengen geprüft werden.

Bei *In-vitro*-Permeationsstudien an isolierter Schweinecornea war die Ausgangsverbindung ZK 216771 bereits nach 30 min nur noch in Spuren im Akzeptorkompartiment zu detektieren. Stattdessen wurde ein polareres, bisher nicht näher identifiziertes Abbauprodukt erfasst, dessen Konzentration im Akzeptorkompartiment linear mit der Zeit zunahm. Da es sich bei ZK 216771 nicht wie im Fall von MMF um ein Prodrug handelt, sondern das polarere Abbauprodukt als unwirksam zu betrachten ist, wurde von einer *In-vivo*-Anwendung Abstand

genommen.

Aufgrund der wesentlich geringeren Wasserlöslichkeit von ZK 247756 konnte die für ZK 216771 entwickelte Rezeptur nicht erfolgreich genutzt werden. Zum Lösungserfolg führte eine Mikroemulsion (ME), die aus den Komponenten Rizinusöl, Cremophor<sup>®</sup> RH 40, Macrogol 300 und Wasser für Injektionszwecke bestand und der 15% HP- $\gamma$ -CD zugefügt waren (ME-CD).

Im Permeationsversuch mit 0,25% ZK 247767 in ME-CD an isolierter Schweinecornea<sup>T</sup>, erfolgte jedoch während des gesamten Versuchzeitraums keine Arzneistofffreisetzung. Dagegen ergaben Penetrationsstudien an isolierter Schweinecornea<sup>T</sup> akzeptable Penetrationsraten von ZK 247767 und ermutigten zur Durchführung von *In-vivo*-Studien an Ratten nach Keratoplastik.

Die Transplantatüberlebensrate nach Anwendung dieser ZK 247767-Formulierung (ME-CD-SEGRA) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe sowie einer Vehikelgruppe (ME-CD ohne Wirkstoff) war signifikant verlängert. Das Transplantat wurde bei der Kontrollgruppe nach  $11,7 \pm 1,2$  Tagen, bei der Vehikelgruppe nach  $15,0 \pm 1,5$  Tagen und bei der SEGRA-Gruppe erst nach  $42,2 \pm 4,0$  Tagen abgestoßen. Vermutlich gibt die ME-Formulierung den Arzneistoff verzögert, aber in therapeutisch relevanten Konzentrationen frei. Dabei erscheint eine geeignete Rezeptur – erstmalig ME zur okularen Anwendung (die physiologische Kompatibilität bliebe zu prüfen) – für einen hochwirksamen Glucocorticoidrezeptoragonist gefunden zu sein, womit sich eine Perspektive für ein neues, hoffnungsvolles Therapiekonzept in der Ophthalmologie eröffnet.

# ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schnitt durch den Augapfel; nach [177]	5
Abb. 2: Tränenfilm; nach [177]	8
Abb. 3: Aufbau der Cornea; nach [185]	11
Abb. 4: Wege, die die Bioverfügbarkeit topisch applizierter Ophthalmika beeinflussen; nach [122]	13
Abb. 5: Absorptionswege topisch applizierter Ophthalmika; nach [122]	14
Abb. 6: Weiter (A) und enger (B) Kammerwinkel; nach [146]	15
Abb. 7: Hypothese für die Induktion molekularer Mechanismen für klassische GC und SEGRA; nach [196]	20
Abb. 8: Ablauf der Immunkaskade mit Angriffsorten von Cyclosporin und Mycophenolat-mofetil; nach [179]; Doppelstrich: Hemmung durch MMF	35
Abb. 9: Chemische Struktur (a) und zylindrische Gestalt (b) eines $\beta$ -Cyclodextrin-Moleküls	37
Abb. 10: Gleichgewicht: Wirtsfreier Arzneistoff und Gastmolekül (Cyclodextrin) mit ihrem 1:1-Komplex; nach [118]	39
Abb. 11: Gleichgewicht: Freier Arzneistoff und Cyclodextrin mit ihrem 1:2-Komplex; nach [118]	39
Abb. 12: Der vermutliche Mechanismus der Arzneistoffpenetration von wässrigen, cyclodextrinhaltigen Augentropfen; nach [122]	40
Abb. 13: Verschiedene Typen von Löslichkeitsisothermen; nach [81]; A: löslicher Komplex; A <sub>L</sub> : linear, A <sub>P</sub> bzw. A <sub>N</sub> : nicht linear bei höherer CD-Konzentration; B: B <sub>S</sub> : Komplex besitzt schlechtere Löslichkeit als das Substrat, B <sub>I</sub> : Komplex fällt nach Erreichen einer Löslichkeitsgrenze aus	52
Abb. 14: Konstanter Konzentrationsgradient eines durch die Membranbarriere M diffundierenden Stoffes; (D = Donatorphase, A = Akzeptorphase; c (D/A): Konzentration in D/A); nach [136]	54
Abb. 15: Permeabilitätskoeffizienten von Mepindolol (0,5%) durch isolierte Schweinecornea <sup>E</sup> ; Mittelwert $\pm$ SD (n = 6-10); *signifikant zur Referenz (sine CD) für p < 0,05	64
Abb. 16: Permeation von $\alpha$ -CD durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> (Ausgangslösung: 3,7% $\alpha$ -CD); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	66
Abb. 17: Permeation von HP- $\alpha$ -CD durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> (Donatorlösung: 12,5% HP- $\alpha$ -CD); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	69
Abb. 18: Permeation von HP- $\beta$ -CD durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> (Donatorlösung: 12,5% HP- $\beta$ -CD); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	70
Abb. 19: Permeation von HP- $\gamma$ -CD durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> (Donatorlösung: 12,5% HP- $\gamma$ -CD); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	70
Abb. 20: Permeabilitätskoeffizienten von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) allein und in Kombination mit 0,5% (bezogen auf die Base) Mepindololsulfat (MEP) ohne/ unter Zugabe von 12,5% HP- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -CD (Schweinecornea <sup>E</sup> ); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5-9); *signifikant gegenüber der jeweiligen Referenz (sine CD); p < 0,05 (t-Test)	76
Abb. 21: Permeabilitätskoeffizienten von 0,5% Mepindolol (MEP) allein und in Kombination mit 2% Pilocarpin (P) unter Zugabe von 12,5% HP- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -CD (Schweinecornea <sup>E</sup> ); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5-9); *signifikant gegenüber der jeweiligen Referenz (sine CD) für p < 0,05 (t-Test)	78
Abb. 22: Arzneistofffreisetzung Q <sub>300</sub> [%] von Mepindolol (MEP) und Pilocarpin (P) nach 300 min (Schweinecornea <sup>E</sup> ); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5-9); *signifikant zum jeweiligen Wert in P/MEP für	



p < 0,05 (Single-Factor-ANOVA)	79
Abb. 23: Löslichkeitsisothermen von Pindolol (PIN) in GBR-Puffer pH 7,4; (A): nach Autoklavieren (121°C, 200 kPa, 15 min); n = 3	82
Abb. 24: FTIR-Spektren von MEP/ $\alpha$ -, $\beta$ -CD (1 : 1); Ordinate: Transmission [%], Abszisse: Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]; PM = Physikalische Mischung, LP = Lyophilisat	85
Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des cornealen Schweineepitheliums <sup>E</sup> , Vergrößerung x20000	88
Abb. 26: MPA-Spiegel im Kammerwasser des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert $\pm$ SD (n = 4); *signifikanter Unterschied zwischen MMF/CD und MMF/SP für p < 0,05 (t-Test und Single-Factor-ANOVA)	93
Abb. 27: MPA-Gewebespiegel im Kaninchenauge nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert $\pm$ SD (n = 4); *signifikanter Unterschied zwischen MMF/CD und MMF/SP für p < 0,05 (t-Test und Single-Factor-ANOVA)	94
Abb. 28: MPA-Spiegel im Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert $\pm$ SD (n = 4)	95
Abb. 29: MPA-Spiegel im Plasma des Kaninchenauges nach Applikation von MMF/CD und MMF/SP; Mittelwert $\pm$ SD (n = 4)	95
Abb. 30: MMF-Gewebespiegel im Kaninchenauge nach Applikation von MMF/SP: Cornea (CR), Conjunctiva (CJ), Sclera (SC) und Iris-Ziliarkörper (IZ); Mittelwert $\pm$ SD (n = 4)	96
Abb. 31: Kumulative Permeabilitätsraten durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> für das polarere Abbauprodukt von ZK 216771 (Kalibrierung mit der Ausgangsverbindung); Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	107
Abb. 32: Kumulative Permeationsraten von ZK 247756 (ME-CD-SEGRA) durch die synthetische Membran Nephrophan <sup>®</sup> ; Mittelwert $\pm$ SD (n = 5)	111
Abb. 33: Penetration von ZK 247756 (ME-CD-SEGRA) in isolierte Schweinecornea, Mittelwert $\pm$ SD (n = 4); (*) signifikant zum 30 bzw. 60 min-Wert (t-Test und Single-Factor ANOVA)	112
Abb. 34: Transplantatüberlebensrate/zeit nach Keratoplastik bei Lewis-Ratten	114
Abb. 35: Permeationszelle	131
Abb. 36: Permeationsapparatur für Schweinecornea und Nephrophan <sup>®</sup>	132

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften und Zusammensetzung der humanen Tränenflüssigkeit; nach [177]	9
Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des Kammerwassers <sup>1</sup> im Vergleich zum Blutplasma; nach [177]	10
Tabelle 3: Zusammenfassung der wichtigsten molekularen Mechanismen einer Anzahl von Glucocorticoid-Nebenwirkungen; nach [196]	21
Tabelle 4: Chemische Struktur der verwendeten $\beta$ -Blocker	26
Tabelle 5: Relative Molekülmassen ( $M_r$ ), Säure-Baseeigenschaften und Verteilungs-koeffizienten ( $V_K$ ) der verwendeten $\beta$ -Rezeptorenblocker	27
Tabelle 6: Pharmakologische Wirkungsparameter von $\beta$ -Blockern; nach [108]; ISA = Intrinsische sympathomimetische Aktivität als Maß für die agonistische Wirkung	29
Tabelle 7: Handelspräparate (Betarezeptorenblocker in Ophthalmika)	32
Tabelle 8: Stabilität von ZK 216771 in 0,05 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) bei 37°C	36
Tabelle 9: Einige Charakteristika der nativen $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Cyclodextrine und ausgewählter Derivate	38
Tabelle 10: Einfluss von Cyclodextrinen auf die Eigenschaften einiger okular angewendeter Arzneistoffe	41

Tabelle 11: Schwerlösliche Arzneistoffe	50
Tabelle 12: Effektive Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{\text{eff}}$ ) und nach 300 min kumulativ freigesetzte Arzneistoffmenge ( $Q_{300}$ ) für Betablocker (Schweinecornea <sup>E</sup> )	59
Tabelle 13: Permeabilitätsparameter von Mepindolol (MEP; 0,5% – bezogen auf die Base) sowie aus $\alpha$ - und HP- $\alpha$ -CD-Lösungen (isolierte Schweinecornea <sup>E</sup> )	63
Tabelle 14: Permeationsparameter von Mepindolol (MEP; 0,5% – bezogen auf die Base) ohne/nach Vorbehandlung der Schweinecornea <sup>E</sup> mit Cyclodextrin (CD)-Lösungen	65
Tabelle 15: Permeationsparameter von Mepindolol (MEP) durch isolierte Schweinecornea <sup>E</sup> sowie in Gegenwart von 12,5% hydroxypropyliertem $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Cyclodextrin (CD) und 3,7% $\alpha$ -CD	68
Tabelle 16: Permeationsparameter von Mepindololsulfat (MEP) durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> sowie in Gegenwart von HP- $\beta$ / $\gamma$ -CD und $\alpha$ -CD	69
Tabelle 17: Permeationsparameter für Pindolol (0,15%; aus Pindoptan <sup>®</sup> bzw. 12,5% HP- $\beta$ / $\gamma$ -CD) durch isolierte Schweinecornea <sup>E</sup>	71
Tabelle 18: Permeationsparameter von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) durch isolierte Schweinecornea <sup>E</sup> ( <sup>1</sup> Schweinecornea <sup>T</sup> ) sowie in Gegenwart von Mepindolol (MEP, 0,5% – bezogen auf die Base) und 12,5% hydroxy-propyliertem $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Cyclodextrin (CD)	74
Tabelle 19: Permeationsparameter von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) durch isolierte Schweinecornea <sup>T</sup> (ohne/ mit 12,5% HP- $\beta$ / $\gamma$ -CD)	74
Tabelle 20: Permeationsparameter von 0,5% (berechnet auf die Base) Mepindololsulfat (MEP) durch isolierte Schweinecornea <sup>E</sup> sowie in Gegenwart von 2% Pilocarpinhydrochlorid (P) und 12,5% hydroxypropyliertem $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Cyclodextrin (CD)	77
Tabelle 21: Stabilitätskonstanten von Pindolol (PIN)/Cyclodextrin (CD)-Komplexen	81
Tabelle 22: Löslichkeit ( $c_s$ ) von Pindolol durch hydroxypropyliertes $\beta$ / $\gamma$ -Cyclodextrin (CD) im Vergleich	83
Tabelle 23: Physikalische Kenngrößen einer MMF/HP- $\beta$ -CD-Lösung; nach [202]	91
Tabelle 24: MPA-Spiegel (30 und 60 min) im Kaninchenauge nach Applikation von MPA/CD bzw. MMF/CD	97
Tabelle 25: MPA-Konzentrationen nach Applikation von MMF/CD, MMF/SP und MPA/CD im Referenzauge (links)	98
Tabelle 26: Sättigungslöslichkeit ( $c_s$ ) von ZK 216771 in wässrigen Cyclodextrinlösungen	104
Tabelle 27: Rezeptur wässriger Augentropfen von ZK 216771	105
Tabelle 28: Stabilität von ZK 216771 in SPP pH 7,0 (33°C)	106
Tabelle 29: Löslichkeit von ZK 247756 bei pH 4,0; nach [182]	108
Tabelle 30: Mikroemulsion (ME) zur okularen Anwendung; nach [241]	109
Tabelle 31: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Mikroemulsion (ME); nach [241]	110
Tabelle 32: Augentropfenrezeptur für ZK 247756 (Mikroemulsionsbasis; ME-CD-SEGRA)	110
Tabelle 33: Mittlere Transplantatüberlebenszeit (ÜLZ) nach Keratoplastik des rechten Auges bei Lewis-Ratten	113
Tabelle 34: 0,5%ige Betablocker-Lösungen für die cornealen Permeationsstudien <i>in vitro</i> (berechnet auf die jeweilige Base)	134
Tabelle 35: Rezepturen für okulare MMF/MPA-Formulierungen	137
Tabelle 36: Zusammensetzung der Gemischten Mizellen; nach [182]	140
Tabelle 37: Versuchsgruppen bei lokaler Therapie mit ZK 247756 nach Keratoplastik	142

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ABDEL RAHMAN, A.A., KHIDR, S.H., AHMED, S.M., ABOUTALEB, A.E., Evaluation of chloramphenicol- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37, 34-37 (1991)
- 2 AHMED, I., GOKHALE, R.D., SHAH, M.V., PATTON, T.F., Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea, *J. Pharm. Sci.* 76, 583-586 (1987)
- 3 AHMED, I., PATTON, T., Effect of pH and buffer on precorneal disposition and ocular penetration of pilocarpine in rabbits, *Int. J. Pharm.* 19, 215-227 (1984)
- 4 AHMED, I., PATTON, T.F., Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 584-587 (1985)
- 5 AKIYAMA, S., YOKOYAMA, T., TAKANO, T., KOBAYASHI, C., KANAI, A., Application of cyclosporin for corneal graft, *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 97, 378-382 (1993)
- 6 ALLISON, A.C., ALMQUIST, S.J., MULLER, C.D., In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, *Transplant. Proc.* 23, Suppl. 2, 10-14 (1991)
- 7 ANAIZI, N.H., SWENSON, C.F., DENTINGER, P.J., Stability of mycophenolate mofetil in an extemporaneously compounded oral liquid, *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 55, 926-929 (1998)
- 8 ASHTON, P., PODDER, S.K., LEE, V.H.L., Formulation influence on conjunctival penetration of four beta-blockers in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Pharm. Res.* 8, 1166-1174 (1991)
- 9 Ausschuss für Arzneyspezialitäten, Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht: Cellcept<sup>®</sup>, CPMP 767, Rev. 5 (2003)
- 10 AUTERHOFF, H., KNABE, J., HÖLTJE, H.D., Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, S. 512-524 (1994)
- 11 BABIOLE, M., WILHELM, F., SCHOCH, C., In vitro corneal permeation of unoprostone isopropyl (UI) and its metabolism in the isolated pig eye, *J. Ocular Pharmacol. Ther.* 17, 159-172 (2001)
- 12 BARY, A.R., TUCKER, I.G., DAVIES, N.M., Considerations in the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortisone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 237-244 (2000)
- 13 BAUER, K.H., FRÖMMING, K.-H., FÜHRER, C. (Hrsg.), Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 4., durchgesehene Auflage, S. 172-173 (1993)
- 14 BAUER, K.H., FRÖMMING, K.-H., FÜHRER, C. (Hrsg.), Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart/New York, 6. durchgesehene und korrigierte Auflage, S. 180 (1999)
- 15 BELVISI, M.G., WICKS, S.L., BATTRAM, C.H., BOTTOMS, S.E., REDFORD, J.E., WOODMAN, P., BROWN, T.J., WEBBER, S.E., FOSTER, M.L., Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression

- from transactivation activity, *J. Immunol.* 166, 1975-1982 (2001)
- 16 BENSON, H., ALTO, P., Permeability of the cornea to topically applied drugs, *Arch. Ophthalmol.* 91, 313-327 (1974)
  - 17 BERNDT, S.M., Entwicklung und Charakterisierung galenischer Formulierungen zur potentiellen nasalen Anwendung von Androstendion und Levodopa, Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin (2000)
  - 18 BERTELMANN, E., JAROSZEWSKI, J., PLEYER, U., Corneal allograft rejection: current understanding, 2. Clinical implications, *Ophthalmologica* 216, 2-12 (2002)
  - 19 BERTELMANN, E., KNAPP, S., RIECK, P., KEIPERT, S., HARTMANN, C., PLEYER, U., Transkornealer – parakornealer Penetrationsweg für lokal applizierte Pharmaka am Auge – Mycophenolat Mofetil als Modellsubstanz, *Ophthalmologe* 100, 696-701 (2003)
  - 20 BISLAT, M., NYSTRÖM, C., EDMAN, P., Influence of dissolution rate of sparingly soluble drugs on corneal permeability in vitro, *Int. J. Pharm.* 63, 49-56 (1990)
  - 21 BRECHUE, W.F., MAREN, T.H., pH and drug ionization affects ocular pressure lowering of topical carbonic anhydrase inhibitors, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 2581-2587 (1993)
  - 22 BRON, A.M., GARCHER, C.P., SIRBAT, D., ALLAIRE, C.M., LABLACHE-COMBIER, M.J., TRINQUAND, C.J., Comparison of two fixed beta blocker-pilocarpine combinations: The carteolol study group, *Eur. J. Ophthalmol.* 4, 351-356 (1997)
  - 23 BRUCHHAUSEN, VON F., EBEL, S., FRAHM, A.W., HACKENTHAL, E., Hagers Handbuch, Band 9, Stoffe P-Z, Springer Verlag, Berlin (1993)
  - 24 BRUCHHAUSEN, VON F., EBEL, S., FRAHM, A.W., HACKENTHAL, E., Hagers Handbuch, Band 7, Stoffe A-D, Springer Verlag, Berlin (1993)
  - 25 BRUCHHAUSEN, VON F., EBEL, S., FRAHM, A.W., HACKENTHAL, E., Hagers Handbuch, Band 8, Stoffe E-O, Springer-Verlag, Berlin (1993)
  - 26 BUCOLO, C., SPADARO, A., MANGIAFICO, S., Pharmacological evaluation of a new timolol/pilocarpine formulation, *Ophthalmic Res.* 30, 101-106 (1998)
  - 27 BURGER, A., WACHTER, H. (Hrsg.), Hunnius: Pharmazeutisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin/New York, 7. völlig neubearbeitete und stark erweiterte Auflage, S. 1103 (1993)
  - 28 BURGER, A., WACHTER, H. (Hrsg.), Hunnius: Pharmazeutisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin/New York, 7. völlig neubearbeitete und stark erweiterte Auflage, S. 196 (1993)
  - 29 CAMBER, O., An in vitro model for determination of drug permeability through the cornea, *Acta Pharm. Suec.* 22, 335-342 (1985)
  - 30 CAPPELLO, B., CARMIGNANI, C., IERVOLINO, M., IMMACOLATA LA ROTONDA, M., FABRIZIO SAETTONE, M., Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and water-soluble polymers: in vitro/in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 213, 75-81 (2001)
  - 31 CARNEY, L.G., HILL, R.M., Human tear buffering capacity, *Arch. Ophthalmol.* 97,

- 951-952 (1979)
- 32 CARNEY, L.G., HILL, R.M., Human tear pH/ Diurnal variations, *Arch. Ophthalmol.* 94, 821-824 (1976)
  - 33 CHAO, J., LI, J., MENG, D., HUANG, S., Preparation and study on the solid inclusion complex of sparflloxacin with HP-beta-cyclodextrin, *Spectrochim. Acta A. Mol Biomol. Spectrosc.* 59, 705-711 (2003)
  - 34 CHEEKS, L., KASWAN, R.L., GREEN, K., Influence of vehicle and anterior chamber protein concentration on cyclosporin penetration through the isolated rabbit cornea, *Curr. Eye Res.* 11, 641-649 (1992)
  - 35 CHRAI, S.S., PATTON, T.F., MEHTA, A., ROBINSON, J.R., Lacrimal and instilled fluid dynamics in rabbit eyes, *J. Pharm. Sci.* 62, 1112-1121 (1973)
  - 36 Ciba-Geigy AG, Division Pharma, Sicherheitsdatenblatt, Trasicor/WS (1994)
  - 37 COUPLAND, S.E., PENFOLD, P.L., BILSON, F.A., Hydrolases of anterior segment tissues in the normal human, pig and rat eye: a comparative study, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 232, 182-191 (1994)
  - 38 CROSSON, C.E., KLYCE, S.D., BEUERMANN, R.W., Epithelial wound closure in the rabbit cornea, *Invest. Ophthalmol.* 27, 464-473 (1986)
  - 39 CYCLOLAB, Products and Prices of Cyclodextrin complexes and derivatives, Budapest (1994)
  - 40 DAVIES, N.M., WANG, G., TUCKER, I.G., Evaluation of a hydrocortisone/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin solution for ocular drug delivery, *Int. J. Pharm.* 156, 201-209 (1997)
  - 41 DIBBERN, H.W., UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe, Editio Cantor, Aulendorf (1985)
  - 42 DINNENDAHL, V., FRICKE, U., Arzneistoffprofile: Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe, GOVI Verlag GmbH, Pharmazeutischer Verlag, Eschborn (1981)
  - 43 DOANE, M.G., JENSEN, A.D., DOHLMANN, C.H., Penetration routes of topically applied eye medication, *Am J. Ophthalmol.* 85, 383-386 (1978)
  - 44 DOLDER, R., SKINNER, F.S. (Hrsg.), Biopharmazeutische Aspekte der Augenarzneizubereitungen, In: Ophthalmika: Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 354-368 (1990)
  - 45 DOLDER, R., SKINNER, F.S. (Hrsg.), Codex der Arznei- und Hilfsstoffe, In: Ophthalmika: Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 274-284 (1990)
  - 46 DONN, A., MAURICE, D.M., MILLS, N.L., Studies on the living cornea in vitro, *Arch. Ophthalmol.* 62, 741-747 (1959)
  - 47 DOORNE, VAN H., Interactions between cyclodextrins and ophthalmic drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 133-139 (1993)
  - 48 DRAGO, F., EMMI, I., MARINO, V., Effects of beta blockers association with pilocarpine on rabbit intraocular pressure and heart rate, *Pharmacol. Res.* 4, 299-302 (1997)

- 49 DUNCKER, G., REICHELT, J., Effects of the pharmaceutical cosolvent hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on porcine corneal endothelium, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236, 380-389 (1998)
- 50 EBEL, S., Würzburger Skripten zur Analytik, Reihe: Statistik, Teil 3, Würzburg (1992)
- 51 ECHEZARRETA-LÓPEZ, M., VILA-JATO, J.L., TORRES-LABANDEIRA, J.J., The effects of cyclodextrins on the incompatibility dexamethasone-polymyxin B in solution, In: Szejtli, J., Szenté, L., Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins, Kluwer Academic Publishers, S. 457-460 (1996)
- 52 EHLERS, N., Morphology and histochemistry of the corneal epithelium of mammals, *Acta anat.* 75, 161-198 (1970)
- 53 ESCLUSA-DÍAZ, M.T., PÉREZ-MARCOS, M.B., VILA-JATO, J.L., TORRES-LABANDEIRA, J.J., Improvement in the dissolution properties of ketoconazole through multicomponent  $\beta$ -cyclodextrin complexation, In: Szejtli, J., Szenté, L., Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins, Kluwer Academic Publishers, 305-308 (1996)
- 54 Europäisches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart – Govi-Verlag, Pharm. Verlag GmbH, Eschborn, 3. Ausgabe (1997)
- 55 Fachinformation für Ärzte und Apotheker, Rote Liste-Online (2004)
- 56 Fachinformation Timpilo<sup>®</sup>, Chibret (2001)
- 57 FIEDLER, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Canto Verlag, Aulendorf (1989)
- 58 FISCHER, A., Untersuchung von Mycophenolatmofetil in verschiedenen Vehikelsystemen zur dermalen Anwendung, Diplomarbeit, Halle-Wittenberg (2000)
- 59 FLOOD, K.G., REYNOLDS, E.R., SNOW, N.H., Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 903, 49-65 (2000)
- 60 FRAUNFELDER, F.T., Ocular  $\beta$ -blockers and systemic effects, *Arch. Int. Med.* 146, 1073-1074 (1986)
- 61 FREEDMAN, K.A., KLEIN, J.W., Beta-cyclodextrins enhance bioavailability of pilocarpine, *Curr. Eye Res.* 12, 641-647 (1993)
- 62 FREUNDENBERG, K., CRAMER, F., PLIENINGER, H., Inclusion compounds of physiologically active organic compounds, *Patent No.* 895, 769 (1953)
- 63 FRIDRIKSDÓTTIR, H., LOFTSSON, T., STEFÁNSSON, E., Formulation and testing of methazolamide/cyclodextrin eye drop solutions, *J. Control. Release* 44, 95-99 (1997)
- 64 FRÖMMING, K.-H., GELDER, T., MEHNERT, W., Inclusion compound of  $\beta$ -cyclodextrin and vitamin A acetate, *Acta Pharm. Technol.* 34, 152-155 (1988)
- 65 FRÖMMING, K.-H., WEDELICH, V., MEHNERT, W., Einschlussverbindungen von Cyclodextrinen mit Piperazin, *Arch. Pharm.* 320, 294-297 (1987)
- 66 GLASER, E., SURMANN, P., Praktische Mathematik in der Pharmazie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 198 ff. (1981)

- 67 GONDHOWIARDJO, T.D., HAERINGEN, VAN N.J., HOEKZEMA, R., PELS, L., KIJLSTRA, A., Detection of aldehyde dehydrogenase activity in human corneal extracts, *Curr. Eye Res.* 10, 1001-1007 (1991)
- 68 GRANERO, G., LONGHI, M., Thermal analysis and spectroscopic characterization of interactions between a naphthoquinone derivative with HP-beta-CD or PVP, *Pharm. Dev. Technol.* 7, 381-390 (2002)
- 69 GRANT, R.L., ACOSTA, D., Prolonged adverse effects of benzalconium chloride and sodium dodecyl sulfate in a primary culture system of rabbit corneal epithelial cells, *Fund. Appl. Toxicol.* 33, 71-82 (1996)
- 70 GRASS, G.M., ROBINSON, J.R., Mechanisms of corneal drug penetration II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement, *J. Pharm. Sci.* 77, 15-23 (1988)
- 71 GREEN, K.E., KEARSE, C.E., Ocular penetration of topical Delta9-tetrahydrocannabinol from rabbit corneal or cul-de-sac application site, *Curr. Eye Res.* 21, 566-570 (2000)
- 72 GRUNENBERG, P., LAICHER, A., Validierung einer Methode zur Partikelgrößenbestimmung mittels Laser-Streulicht-Analyse, *Pharmazie* 49, 585-589 (1994)
- 73 GUDMUNDSDÓTTIR, E., STEFÁNSSON, E., BJARNADÓTTIR, G., SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F., GUDMUNDSDÓTTIR, G., MÁSSON, M., LOFTSSON, T., Methazolamide 1% in cyclodextrin solution lowers IOP in human ocular hypertension, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3552-3554 (2000)
- 74 HAERINGEN, VAN N.J., Tränenflüssigkeit, In: Hockwin, O. (Hrsg.), Biochemie des Auges, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S.107 (1985)
- 75 HARRE, M., Schering AG, Berlin, Persönliche Information
- 76 HARTMANN, V., KEIPERT, S., Physiko-chemische in vitro- und in vivo-Charakterisierung von Polymeren zur okularen Anwendung, *Pharmazie* 55, 440-443 (2000)
- 77 HABE, A., Entwicklung, Charakterisierung und Strukturuntersuchungen von tensidhaltigen Mehrkomponentensystemen zur okularen Anwendung, Dissertation Humboldt Universität zu Berlin (1996)
- 78 HABE, A., KEIPERT, S., Development and characterization of microemulsions for ocular application, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 195-197 (1997)
- 79 HAUSE, I.A., Glucocorticoide in der Nierentransplantation, *Pharmazie in unserer Zeit* 4, 335 (2003)
- 80 HIGUCHI, T., CONNERS, K., Phase solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117-212 (1965)
- 81 HIGUCHI, T., CONNORS, K.A., Advances in analytical chemistry and instrumentation, New York Interscience, New York, S. 128-131 (1965)
- 82 HOOIJMAAIJER, E., BRANDL, M., NELSON, J., LUSTIG, D., Degradation products of mycophenolate mofetil in aqueous solution, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 25, 361-365 (1999)

- 83 HUANG, H.-S., SCHOENWALD, R.D., LACH, J.L., Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: assessment of barrier contributions, *J. Pharm. Sci.* 72, 1272-1286 (1983)
- 84 HULL, D.S., HINE, J.E., EDELHAUSER, H.F., HYNDIUK, R.A., Permeability of the isolated rabbit cornea to corticosteroids, *Invest. Ophthalmol.* 13, 457-459 (1974)
- 85 HURVITZ, L.M., KAUFMAN, P.L., ROBIN, A.L., WEINREB, R.N., CRAWFORD, K., SHAW, B., New developments in the drug treatment of glaucoma, *Drugs* 41, 514-532 (1991)
- 86 IRIE, T., UEKAMA, K., Pharmaceutical applications of cyclodextrins, III. Toxicological issues and safety evaluation, *J. Pharm. Sci.* 86, 147-162 (1997)
- 87 JANSEN, T., XHONNEUX, B., MESENS, J., BORGERS, M., Beta-cyclodextrins as vehicles in eye-drop formulations: an evaluation of their effects on rabbit corneal epithelium, *Lens Eye Toxic Res.* 7, 459-468 (1990)
- 88 JARHO, P., Cyclodextrins in eye drop formulations: studies with pilocarpine prodrugs, anandamide and dipivefrine, Doctoral dissertation, University of Kuopio, Finland (1997)
- 89 JARHO, P., JÄRVINEN, K., URTTI, A., STELLA, V.J., JÄRVINEN, T., The use of cyclodextrins in ophthalmic formulations of dipivefrin, *Int. J. Pharm.* 153, 225-233 (1997)
- 90 JARHO, P., JÄRVINEN, K., URTTI, A., STELLA, V.J., JÄRVINEN, T., Modified  $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ -CD) with viscous vehicle improves the ocular delivery and tolerability of pilocarpine prodrug in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.* 48, 264-270 (1996)
- 91 JARHO, P., URTTI, A., PATE, D.W., SUHONEN, P., JÄRVINEN, T., Increase in aqueous solubility, stability and in vitro corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* 137, 209-217 (1996)
- 92 JÄRVINEN, K., JÄRVINEN, T., THOMPSON, O., STELLA, V.J., The effect of a modified  $\beta$ -cyclodextrin, SBE- $\beta$ -CD, on the aqueous stability and ocular absorption of pilocarpine, *Curr. Eye Res.* 13, 897-905 (1994)
- 93 JÄRVINEN, T., JÄRVINEN, K., Prodrugs for improved ocular drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.* 19, 203-224 (1996)
- 94 JÄRVINEN, T., JÄRVINEN, K., URTTI, A., THOMPSON, D., STELLA, V.J., Sulfobutyl-ether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ -CD) in eye drops improves the tolerability of a topically applied pilocarpine prodrug in rabbits, *J. Ocular Pharmacol. Ther.* 11, 95-106 (1995)
- 95 JIANBIN, C., LIANG, C., HAO, X., DONPIN, M., Preparation and study on the solid inclusion complex of ciprofloxacin with beta-cyclodextrin, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 58, 2809-2815 (2002)
- 96 KANAI, A., ALBA, R.M., TAKANO, T., KOBAYASHI, C., NAKAJIMA, A., KURIHARA, K., YOKOYAMA, T., FUKAMNI, M., The effect on the cornea of alpha-cyclodextrin vehicle for cyclodextrin eye drops, *Transplant. Proc.* 21, 3150-3152 (1989)
- 97 KANA, J.S., HOFFMANN, F., BUCHEN, R., KROLIK, A., WIEDERHOLT, M., Rabbit corneal allograft survival following topical administration of cyclosporin A, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 686-690 (1982)



- 98 KAUR, I.P., SMITHA, R., AGGARWAL, D., KAPIL, M., Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics, *Int. J. Pharm.* 248, 1-14 (2002)
- 99 KEARSE, E.C., GREEN, K., Effect of vehicle upon in vitro transcorneal permeability and intracorneal content of Delta9-tetrahydrocannabinol, *Curr. Eye Res.* 20, 496-501 (2000)
- 100 KEIPERT, S., Ophthalmika: Etablierte Arzneiformen und neue Konzepte, In: Müller, R.H., Hildebrand, G.E., Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 37-58 (1997)
- 101 KEIPERT, S., FEDDER, J., BÖHM, A., HANKE, B., Interactions between cyclodextrins and pilocarpine – as an example of a hydrophilic drug, *Int. J. Pharm.* 142, 153-163 (1996)
- 102 KEIPERT, S., SCHULZ, G., Mikroemulsionen auf Saccharoseesterbasis, Teil 1: In-vitro-Charakterisierung, *Pharmazie* 49, 195-197 (1994)
- 103 KEIPERT, S., SIEBENBRODT, I., Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe, Teil 3: Optimierte, tropfbare Rezepturen auf Polyacrylatbasis, *Pharmazie* 45, 596-599 (1990)
- 104 KEIPERT, S., SIEBENBRODT, I., LÜDERS, F., BORNSCHEIN, M., Mikroemulsionen und ihre potentielle pharmazeutische Nutzung, *Pharmazie* 44, 433-444 (1989)
- 105 KEIPERT, S., VOIGT, R., Wechselwirkungen zwischen makromolekularen Hilfsstoffen und Arzneistoffen, 1. Mitteilung: Assoziationstendenzen zwischen Polyvinylalkohol und Lokalanaesthetika, *Pharmazie* 30, 589-590 (1975)
- 106 KONDO, T., IRIE, T., UEKAMA, K., Combination effects of  $\alpha$ -cyclodextrin and xanthan gum on rectal absorption and metabolism of morphine from hollow-type suppositories in rabbits, *Biol. Pharm. Bull.* 19, 280-286 (1996)
- 107 KRISTINSSON, J.K., FRIDRIKSDÓTTIR, H., THÓRISDÓTTIR, S., SIGURDARDÓTTIR, A.M., STEFÁNSSON, E., LOFTSSON, T., Dexamethasone-cyclodextrin-polymer cocomplexes in aqueous eye drops, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1199-1203 (1996)
- 108 KURZ, H.,  $\beta$ -Rezeptorenblocker, In: Ammon, H.P.T., Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3. völlig neu bearbeitete Auflage, S. 177 (1991)
- 109 LARKIN, G., LIGHTMAN, S., Mycophenolate mofetil/ A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease, *Ophthalmology* 106, 370-374 (1999)
- 110 LEE, V.H.L., CHANG, S.C., OSHIRO, C.M., SMITH, R.E., Ocular esterase composition in albino and pigmented rabbits: possible implications in ocular prodrug design and evaluation, *Curr. Eye Res.* 4, 1117-1125 (1985)
- 111 LEE, V.H.L., IIMOTO, D.S., TAKEMOTO, K.A., Subcellular distribution of esterases in the bovine eye, *Curr. Eye Res.* 2, 869-876 (1983)
- 112 LEE, V.H.L., LI, H., Prodrugs for improved ocular drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.* 3, 1-38 (1989)
- 113 LEHMANN, L., KEIPERT, S., GLOOR, M., Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 129-136 (2001)

- 114 LIAW, J., ROBINSON, J.R., The effect of polyethylene glycol molecular weight on corneal transport and the related influence of penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* 88, 125-140 (1992)
- 115 LIAW, J., ROJANASAKUL, Y., ROBINSON, J.R., The effect of drug charge density on corneal transport, *Int. J. Pharm.* 88, 111-124 (1992)
- 116 LIU, F.-Y., KILDSIG, D.O., MITRA, A.K., Beta-cyclodextrin/steroid complexation: Effect of steroid structure equilibria, *Pharm. Res.* 7, 869-874 (1990)
- 117 LOFTSSON, T., BODOR, N., The effect of cyclodextrins on percutaneous transport of drugs, In: Schmidt, E.W., Maibach, H.I., Percutaneous penetration enhancers, CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 335-342 (1995)
- 118 LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., Pharmaceutical application of cyclodextrins, 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.* 85, 1017 (1996)
- 119 LOFTSSON, T., FRIDRIKSDÓTTIR, H., STEFÁNSSON, E., THORISDÓTTIR, S., GUDMUNDSSON, Ö., SIGTHORSSON, T., Topically effective ocular hypotensive acetazolamide and ethoxzolamide formulations in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 503-504 (1994)
- 120 LOFTSSON, T., FRIDRIKSDÓTTIR, H., THORISDÓTTIR, S., STEFÁNSSON, E., SIGURDARDÓTTIR, A.M., GUDMUNDSSON, Ö., SIGTHORSSON, T., 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in topical carbonic anhydrase inhibitor formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1, 175-180 (1994)
- 121 LOFTSSON, T., FRIDRIKSDÓTTIR, H., THORISDÓTTIR, S., STEFÁNSSON, E., The effect of hydroxypropylmethylcellulose on release of dexamethasone from aqueous 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin formulations, *Int. J. Pharm.* 104, 181-184 (1994)
- 122 LOFTSSON, T., JÄRVINEN, T., Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 59-79 (1999)
- 123 LOFTSSON, T., MÁSSON, M., Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice, *Int. J. Pharm.* 225, 15-30 (2001)
- 124 LOFTSSON, T., MÁSSON, M., SIGURJÓNSDÓTTIR, J.F., FRIDRIKSDÓTTIR, H., Enhanced complexation efficacy of cyclodextrins, The 17th Pharmaceutical Technology Conference and Exhibition, Dublin (1998)
- 125 LOFTSSON, T., MÁSSON, M., STEFÁNSSON, E., The effects of cyclodextrins on drug availability in pharmaceutical formulations, The 10th Symposium on Cyclodextrins, Ann Arbor, Michigan (2000)
- 126 LOFTSSON, T., MATTHIASSEN, K., MÁSSON, M., The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs, *Int. J. Pharm.* 262, 101-107 (2003)
- 127 LOFTSSON, T., STEFÁNSSON, E., Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye, *Drug Devel. Ind. Pharm.* 23, 473-481 (1997)
- 128 LOFTSSON, T., STEFÁNSSON, E., FRIDRIKSDÓTTIR, H., THÓRISDÓTTIR, S., KRISTINSSON, J.K., GUDMUNDSDÓTTIR, G., Topical acetazolamide-HP- $\beta$ -CD eye drop solution, The 7th International Symposium on Cyclodextrins, Tokyo (1994)
- 129 LOFTSSON, T., STEFÁNSSON, E., KRISTINSSON, J.K., FRIDRIKSDÓTTIR, H., SVERISSON, T., GUDMUNDSDÓTTIR, G., THÓRISDÓTTIR, S., Topically effective acetazolamide eye-

- drop solution in man, *Pharm. Sci.* 2, 277-279 (1996)
- 130 LONGWELL, A., BIRSS, S., KELLER, N., MOORE, D., Effect of topically applied pilocarpine on tear film pH, *J. Pharm. Sci.* 65, 1654-1657 (1976)
  - 131 LUDWIG, A., LJNLU, N., VAN OOTEGHEM, M., Evaluation of viscous ophthalmic vehicles containing carbomer by slit lamp fluorophotometry in humans, *Int. J. Pharm.* 61, 15-25 (1990)
  - 132 LUDWIG, A., VAN OOTEGHEM, M., The evaluation of viscous ophthalmic vehicles by slit lamp fluorophotometry in humans, *Int. J. Pharm.* 54, 95-102 (1989)
  - 133 MAASZ, J., Röntgendiffraktometrie in der Pharmazie, Untersuchungen zur quantitativen Auswertung und Anforderungen an Apparatur und Probe, Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Dissertation (1986)
  - 134 MAESTRELLI, F., MURA, P., CASINI, A., MINCIONE, F., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C.T., Cyclodextrin complexes of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors as long-lasting topically acting antiglaucoma agents, *J. Pharm. Sci.* 91, 2211-2219 (2002)
  - 135 MANTEL, N., Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration, *Cancer Chemother. Rep.* 50, 163-170 (1966)
  - 136 MARTIN, A.N., Physikalische Pharmazie/ Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen, Hrsg. und vollständig überarbeitet von Leuenberger, H., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 366 (2002)
  - 137 MÁSSON, M., LOFTSSON, T., MÁSSON, G., STEFÁNSSON, E., Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing, *J. Control. Release* 59, 107-118 (1999)
  - 138 MASTMAN, G.L., BLADES, E.J., HENDERSON, J.W., The total osmotic pressure of tears in normal and various pathological conditions, *Arch. Ophthalmol.* 65, 509 (1961)
  - 139 MAURICE, D.M., MISHIMA, S., Ocular pharmacokinetics, In: Sears, M.C., Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, S. 69 (1984)
  - 140 MESTER, U., LOHMANN, C., PLEYER, U., STEINKAMP, G., VOLCKER, E., KRUGER, H.P.S., A comparison of two different formulations of diclofenac sodium 0,1% in the treatment of inflammation following cataract-intraocular lens surgery, *Drugs R. D.* 3, 143-151 (2002)
  - 141 METZ, G., Mycophenolatmofetil, ein neuer Wirkstoff zur Immunsuppression, *Pharmazeut. Zeitung* 33, 36-42 (1996)
  - 142 MIKKELSON, T.J., CHRAI, S.S., ROBINSON, J.R., Altered bioavailability of drugs in the eye due to drug-protein interaction, *J. Pharm. Sci.* 62, 1648-1653 (1973)
  - 143 MITRA, A.K., MIKKELSON, T.J., Mechanism of transcorneal permeation of pilocarpine, *J. Pharm. Sci.* 77, 771-775 (1988)
  - 144 MÜLLER, B.W., MÜLLER, R.H., Bestimmung von Teilchen im submikroskopischen Bereich mit der Photonenkorrelationsspektroskopie, *Pharm. Ind.* 45, 1150-1153 (1983)
  - 145 MUNROE, W.P., RINDONE, J.P., KERSHNER, R.M., Systemic side effects associated with the ophthalmic administration of timolol, *Drug Int. Clin. Pharmacy* 19, 85-89 (1985)

- 146 MUTSCHLER, E., SCHÄFER-KORTING, M., Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 7., völlig neu bearbeitete Auflage, S. 301 (1996)
- 147 MUTSCHLER, E., SCHÄFER-KORTING, M., Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 7., völlig neu bearbeitete Auflage, S. 288 ff. (1996)
- 148 NORN, M.S., Postmortal vital staining of the external eye, *Acta Ophthalmol.* 57, 296-304 (1979)
- 149 ONO, N., ARIMA, H., HIRAYAMA, F., UEKAMA, K., A moderate interaction of maltosyl-alpha-cyclodextrin with Caco-2-cells in comparison with the parent cyclodextrin, *Biol. Pharm. Bull.* 24, 395-402 (2001)
- 150 PALM, D., Erkrankungen und Schädigungen des Auges, In: Fülgraff, G., Palm, D. Pharmakotherapie/ Klinische Pharmakologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 9., neubearbeitete Auflage, S. 361 (1995)
- 151 PATE, D.W., JÄRVINEN, K., URTTI, A., JARHO, P., METTE, F., MAHADEVAN, V., JÄRVINEN, T., Effects of topical anandamides on intraocular pressure in normotensive rabbits, *Life Sci.* 58, 1849-1860 (1996)
- 152 PATTON, T.F., ROBINSON, J.R., Quantitative precorneal disposition of topically applied pilocarpine nitrate in rabbit eyes, *J. Pharm. Sci.* 65, 1295-1301 (1976)
- 153 PATTON, T.F., ROBINSON, J.R., Influence of topical anesthesia on tear dynamics and ocular drug bioavailability in albino rabbits, *J. Pharm. Sci.* 64, 267-271 (1975)
- 154 PEREZ-MARTINEZ, J.I., GINES, J.M., ARIAS, M.J., MOYANO, J.R., MORILLO, E., RUIZ-CONDE, A., SANCHEZ-SOTO, P.J., NOVAK, C., Preparation and characterization of 2,4-D complexes with  $\alpha$ -cyclodextrin, In: Szejtli, J. and Szente, L.: Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins, Kluwer Academic Publishers, S. 623-626 (1996)
- 155 PERGANDE, G., KEIPERT, S., Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe, Teil 1: In vitro-Untersuchungen, *Pharmazie* 45, 582-586 (1990)
- 156 PERGANDE, G., KEIPERT, S., KLATT, A., Antiglaukomatosahaltige Ophthalmika mit prolongierter Wirkung auf Basis makromolekularer Hilfsstoffe, Teil 2: In vivo-Untersuchungen, *Pharmazie* 45, 587-591 (1990)
- 157 PFAU, B., KRUSE, F.E., ROHRSCHEIDER, K., ZORN, M., FIEHN, W., BURK, R.O.W., VOELKER, H.E., Comparison between local and systemic cyclosporine concerning the concentration in conjunctiva, aqueous humor and blood., *Ophthalmologie* 92, 833-839 (1995)
- 158 PFISTER, R.R., BURSTEIN, N., The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study, *Invest. Ophthalmol.* 15, 246-259 (1976)
- 159 PLEYER, U., Immunobiology and prevention of allograft reaction after keratoplasty, Aeolus Press, Buren, Niederlande, S. 22-23 (1996)
- 160 PLEYER, U., Untersuchungen zur Immunbiologie und Prävention der Allograftreaktion

- nach experimenteller Keratoplastik, Habilitationsschrift der Universität Tübingen (1993)
- 161 PLEYER, U., DANNOWSKI, H., VOLK, H.D., RITTER, T., Corneal allograft rejection: current understanding 1. Immunobiology and basic mechanisms, *Ophthalmologica* 215, 254-262 (2001)
  - 162 PLEYER, U., LIEKFELD, A., BAATZ, H., HARTMANN, C., Entzündliche Augen-erkrankungen: Pharmakologische Modulation immunmediierter Erkrankungen des Auges, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 214, 160-170 (1999)
  - 163 PLEYER, U., SHERIF, Z., Corticoids in ophthalmology, *Ernst Schering Res. Found Workshop* 40, 65-81 (2002)
  - 164 PLEYER, U., YANG, J., KNAPP, S., SCHÄCKE, H., SCHMEES, N., ORLIC, N., OTASEVIC, L., DE RUYTER, M., RITTER, T., KEIPERT, S., Effects of a selective steroid receptor agonist (SEGRA) on experimental keratoplasty, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, Im Druck (2004)
  - 165 PORST, H., KNY, L., Zur Stabilität von Pilocarpinhydrochlorid in Augentropfen, *Pharmazie* 40, 23-29 (1985)
  - 166 PORSTMANN, A., DE RUIJTER, M., SEDLÁKOVÁ, K., KNAPP, S., VOGT, K., PLEYER, U., Effects of topically applied Mycophenolate Mofetil on endotoxin-induced Uveitis (EIU), EVER (European Association for Vision and Eye Research) Abstract 3375, Alicante, Spanien (2002)
  - 167 POSE-VILARNOVO, B., SANTANA-PENÍN, L., ECHEZARRETA-LÓPEZ, M., PÉREZ-MARCOS, M.B., VILA-JATO, J.L., TORRES-LABANDEIRA, J.J., Interaction of diclofenac sodium with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in solution, *S.T.P. Pharma Sciences* 9, 231-236 (1999)
  - 168 PRAUSNITZ, M.R., NOONAN, J.S., Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye, *J. Pharm. Sci.* 87, 1479-1488 (1998)
  - 169 RABER, T., Alcon Pharma, Freiburg, Persönliche Information (2004)
  - 170 RAJAGOPALAN, N., CHEN, S.C., CHOW, W.S., A study of the inclusion complex of amphotericin B in the presence of  $\gamma$ -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* 29, 161-168 (1986)
  - 171 RAJEWSKI, R.A., STELLA, V.J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins, 2. In vivo drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 85, 1142-1168 (1996)
  - 172 RAMER, R.M., GASSET, A.R., Ocular penetration of pilocarpine: the effect of pH on the ocular penetration of pilocarpine, *Ann. Ophthalmol.* 7, 293-296 (1975)
  - 173 RAUSCHER, K., VOIGT, J., WILKE I., WILKE, K.-TH., Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis, VEB, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 3., neu bearbeitete und erweiterte Auflage, S.141 (1965)
  - 174 RAVINET, E., MERMOUD, A., BRIGNOLI, R., Four years later: a clinical update on latanoprost, *Eur. J. Ophthalmol.* 13, 162-175 (2003)
  - 175 REDMUND, T.M., DUKE, E.J., COLES, W.H., SIMSON, J.A., CROUCH, R.K., Localization of corneal superoxide dismutase by biochemical and histocytochemical techniques, *Exp. Eye Res.* 38, 369-78 (1984)

- 176 REER, O., BOCK, T.K., MÜLLER, B.W., In vitro corneal permeability of diclofenac sodium in formulations containing cyclodextrins compared to commercial product voltaren ophtha, *J. Pharm. Sci.* 83, 1345-1349 (1994)
- 177 REIM, M., Augenheilkunde, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, S. 8-23 (1990)
- 178 REINHARD, T., REIS, A., KUTKUHN, B., GODEHARDT, E., SPELSBERG, H., ALTHAUS, C., SUNDMACHER, R., Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial, *Br. J. Ophthalmol.* 83, 1268-1271 (1999)
- 179 REIS, A., REINHARD, T., SUNDMACHER, R., ALTHAUS, C., VOISCULESCU, A., KUTKUHN, B., Mycophenolatmofetil (Cell Cept®) bei okulären immunologischen Störungen, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 213, 257-261 (1998)
- 180 REIS, A., REINHARD, T., SUNDMACHER, R., BRAUNSTEIN, C., GODEHARDT, E., , Effect of mycophenolate mofetil, cyclosporin A, and both in combination in a murine graft rejection model, *Br. J. Ophthalmol.* 82, 700-703 (1998)
- 181 REIS, A., REINHARD, T., VOISCULESCU, A., KUTKUHN, B., GODEHARDT, E., SPELSBERG, H., ALTHAUS, C., SUNDMACHER, R., Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial, *Br. J. Ophthalmol.* 83, 1268-1271 (1999)
- 182 RENZ, M., Parenterals, Research and Development/Pharmaceutical Development, Schering AG, Berlin (2001)
- 183 RICHMAN, J.B., TANG-LIU, D.D.-S., A corneal perfusion device for estimating ocular bioavailability in vitro, *J. Pharm. Sci.* 79, 153-157 (1990)
- 184 RICHTER, T., KEIPERT, S., In vitro permeation studies company bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione in microemulsions and in its single components, *Eur. J. of Pharm. and Biopharm.*, Im Druck (2004)
- 185 ROBINSON, J.C., Ocular Anatomy and Physiology relevant to ocular drug delivery, In: Mitra, A.K., Ophthalmic drug delivery systems, Marcel Decker, New York, S. 29-57 (1993)
- 186 ROCHE Produktinformation (2001)
- 187 ROTH, H.J., FENNER, H. (Hrsg.), Pharmazeutische Chemie III, Arzneistoffe: Struktur – Bioreaktivität – Wirkungsbezogene Eigenschaften, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, 2. überarbeitete Auflage, S. 334 (1994)
- 188 ROTH, H.J., FENNER, H. (Hrsg.), Pharmazeutische Chemie III, Arzneistoffe: Struktur – Bioreaktivität – Wirkungsbezogene Eigenschaften, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 3. Auflage (2000)
- 189 RÜCKER, G., NEUGEBAUER, M., WILLEMS, G.G. (Hrsg.), IR-Spektroskopie, Anwendungen in der Pharmazie, In: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 118-136 (1992)
- 190 RÜCKER, G., NEUGEBAUER, M., WILLEMS, G.G. (Hrsg.), Hochleistungs-Flüssigkeitchromatographie, In: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissen-

- schaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 270 (1992)
- 191 SAARI, K.M., JYRKKIÖ, H., SEPPA, H., LOFTSSON, T., STEFÁNSSON, E., Acute and chronic postoperative inflammatory reactions after cataract extraction and intraocular lens implantation, *Exerta Medica International Congress*, 1158 (1998)
  - 192 SANGHAVI, N.M., MAYEKAR, R., FRUITWALA, M., Inclusion complexes of Terfenadine-cyclodextrins, *Drug Dev. Indust. Pharm.* 21, 375-381 (1995)
  - 193 SASAMOTO, Y., HIROSE, S., OHNO, S., ONOE, K., MATSUDA, H., Topical application of cyclosporin ophthalmic solution containing alpha-cyclodextrin in experimental uveitis, *Ophthalmologica* 203, 118-125 (1991)
  - 194 SAX, C.M., SALAMON, C., KAYS, W.T., GUO, J., YU, F.X., CUTHBERTSON, R.A., PIATIGORSKY, J., Transketolase is a major protein in the mouse cornea, *J. Biol. Chem.* 271, 68-74 (1996)
  - 195 SCHÄCKE, H., DÖCKE, W-D., ASADULLAH, K., Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacology & Therapeutics* 96, 23-43 (2002)
  - 196 SCHÄCKE, H., HENNEKES, H., SCHOTTELIUS, A., JAROCH, S., LEHMANN, M., SCHMEES, N., REHWINKEL, H., ASADULLAH, K., SEGRAs: A Novel Class of Anti-inflammatory Compounds, *Ernst Schering Res. Found Workshop*, 357-371 (2002)
  - 197 SCHÄCKE, H., SCHOTTELIUS, A., DÖCKE, W.D., STREHLKE, P., JAROCH, S., SCHMEES, N., REHWINKEL, H., HENNEKES, H., ASADULLAH, K., Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 227-232 (2004)
  - 198 SCHMEES, N., Schering AG, Berlin, Persönliche Information
  - 199 SCHMIDT, G., Rheumatische Erkrankungen – Antiphlogistische Behandlung mit Glucocorticoiden, In: Fülgraff, G., Palm, D., Pharmakotherapie/ Klinische Pharmakologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 9. neubearbeitete Auflage, S. 219-220 (1995)
  - 200 SCHOENWALD, R.D., HUANG, H.-S., Corneal penetration behavior of  $\beta$ -blocking agents, I: physicochemical factors, *J. Pharm. Sci.* 72, 1266-1272 (1983)
  - 201 SCHOENWALD, R.D., WARD, R., Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* 67, 786-788 (1978)
  - 202 SCHOLZ, M., In vitro-Permeationsstudien von hydrophilen Arzneistoffen an okularen Geweben und Zellkulturen, Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin (2003)
  - 203 SCHOLZ, M., KEIPERT, S., PLEYER, U., Mycophenolate mofetil for ocular application, *ARVO Abstracts: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 572 (2001)
  - 204 SCHÖNWALD, R.D., DESHPADE, G.S., RETHWISCH, D.G., BARFKNECHT, C.F., Penetration into the anterior chamber via the conjunctival/scleral pathway, *J. Ocular Pharm. Therap.* 13, 41-59 (1997)
  - 205 SHAW, L.M., SOLLINGER, H.W., HALLORAN, P., MORRIS, R.E., YATSCOFF, R.W., RANSOM, J., TSINA, L., LEOWN, P., HOLT, D.W., LIEBERMAN, R., JAKLITSCH, A.,

- POTTER, J., Mycophenolate mofetil: A report of the consensus panel, *Ther. Drug Monit.* 17, 690-699 (1995)
- 206 SIEBENBRODT, I., KEIPERT, S., Poloxamer-Systems as Potential Ophthalmics, II. Microemulsions, *Eur. J. Pharm.* 39, 25-30 (1993)
- 207 SIEFERT, B., Einfluß von Cyclodextrin auf die Löslichkeit und okulare Verfügbarkeit von Pilocarpin-HCl bzw. Thalidomid/ Penetrations- und Permeationsstudien an isolierter Cornea, Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin (1998)
- 208 SIEFERT, B., KEIPERT S., Influence of  $\alpha$ -cyclodextrin and hydroxyalkylated  $\beta$ -cyclodextrin derivatives on the in-vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions, *J. Pharm. Sci.* 86, 716-720 (1997)
- 209 SIEFERT, B., PLEYER, U., MÜLLER, M., HARTMANN, C., KEIPERT, S., Influence of cyclodextrins on the in vitro corneal permeability and in vivo ocular distribution of thalidomide, *J. Ocular Pharmacol. Ther.* 15, 429-438 (1999)
- 210 SIEG, J.W., ROBINSON, J.R., Vehicle effects on ocular drug bioavailability, II: evaluation of pilocarpine, *J. Pharm. Sci.* 66, 1222-1228 (1977)
- 211 SIVERMAN-KITCHIN, J.E., KELTZ-POMERANZ, M., PAK, G., WASHNIK, K., SHUPACK, J.L., Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses, *J. Am. Acad. Dermatol.* 37, 445-449 (1997)
- 212 STEFÁNSSON, E., THÓRISDÓTTIR, S., GUDMUNDSSON, O.G., LOFTSSON, T., FRIDRIKSDÓTTIR, H., KRISTINSSON, J.K., 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in eye drops. Evaluation of artificial tear-drops in human patients, In: Szejtli, J. and Szenté, L. (Hrsg.), Proceedings of the Eight International Symposium on Cyclodextrins, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, S. 391-394 (1996)
- 213 STEGEMANN, S., Optimierung der oralen Bioverfügbarkeit/ Der Einsatz von lipophilen Drug Delivery Systemen für schwerlösliche Arzneistoffe, *PZ Prisma* 10, 73-85 (2003)
- 214 STELLA, V.J., RAJEWSKI, R.A., Cyclodextrine: their future in drug formulation and delivery, *Pharm. Res.* 14, 556-567 (1997)
- 215 SUGRUE, M., HARRIS, A., ADAMSON, I., Dorzolamide Hydrochloride: A topically active, carbonic anhydrase inhibitor for the treatment of glaucoma, *Drugs of today* 33, 283-298 (1997)
- 216 SUGRUE, M.F., The pharmacology of antiglaucoma drugs, *Pharm. Ther.* 43, 91-138 (1989)
- 217 SUHONEN, P., JÄRVINEN, T., LEHMUSAAARI, K., REUNAMÄKI, T., URTTI, A., Ocular absorption and irritation of pilocarpine prodrug is modified with buffer, polymer, and cyclodextrin in the eyedrop, *Pharm. Res.* 12, 529-533 (1995)
- 218 SUHONEN, P., JÄRVINEN, T., PEURA, P., URTTI, A., Permeability of pilocarpine acid diesters across albino rabbit cornea in vitro, *Int. J. Pharm.* 74, 221-228 (1991)
- 219 SZEJTLI, J., Properties of cyclodextrins as limiting factors, In: Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, S. 291 (1988)
- 220 SZEJTLI, J., CDs and their inclusion complexes, Akadémiai Kiadó, Budapest, S. 32 (1982)



- 221 SZENTE, L., KIS, G.L., SCHOCH, C., FETZ, A., SZEMÁN, J., SZEJTLI, J., Development of a diclofenac-Na/HP- $\gamma$ -CD ophthalmic composition, The 10th International Symposium on Cyclodextrins, Ann Arbor, Michigan, USA (2000)
- 222 TAKANO, T., KOBAYASHI, C., ALBA, R.M., KANAI, A., The immunosuppressive effects of 0,025% cyclosporin eye drops in alpha-cyclodextrin on rabbit corneal allografts, *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 96, 834-840 (1992)
- 223 TEUSCHER, E., Biogene Arzneimittel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 5. Auflage, S. 102 (1997)
- 224 The Pharmaceutical Codex, The Pharmaceutical Press, London, 11th Edition (1979)
- 225 THOMA, K., VETTER, O., Pharmaceutical Quality of Liposomes, Requirement for Applicability, In: Puisieux, F., Couvreur, P., Delattre, J., Devissaguet, J.-P., Liposomes, New systems and new trends in their applications, Editions de Santé, Paris (1995)
- 226 TONJUM, A.M., Permeability of horseradish peroxidase in the rabbit corneal epithelium, *Acta Ophthalmol.* 52, 650-658 (1974)
- 227 UEKAMA, K., KONDO, T., NAKAMURA, K., IRIE, T., ARAKAWA, K., SHIBUYA, M., TANAKA, J., Modification of rectal absorption of morphine from hollow-type suppositories with a combination of  $\alpha$ -cyclodextrin and viscosity-enhancing polysaccharide, *J. Pharm. Sci.* 84, 15-20 (1995)
- 228 ULLMANN, Elektronenmikroskopie, In: Kerker, H., Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 606-607 (1980)
- 229 USAYAPANT, A., KARARA, A.H., NARURKAR, M.M., Effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the ocular absorption of dexamethasone und dexamethasonacetate, *Pharm. Res.* 12, 1495-1499 (1991)
- 230 VAINIO-JYLHÄ, E., VUORI, M-L., PYYKKÖ, K., HUUPPONEN, R., Plasma concentration of topically applied betaxolol in elderly glaucoma patients, *J. Ocular Pharm. Therap.* 17, 207-213 (2001)
- 231 VISOR, G.C., Drug design strategies for ocular therapeutics, *Adv. Drug Delivery Rev.* 14, 269-279 (1994)
- 232 VOIGT, R., Pharmazeutische Technologie, Ullstein Mosby, Berlin/Wiesbaden, 9. neubearbeitete Auflage (1995)
- 233 Voltaren Ophtha CD, Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz, Supplement 3 (2003)
- 234 WACKER CHEMIE, Produktinformation (1998)
- 235 WACKER CHEMIE GMBH, EU-Sicherheitsdatenblatt (91/155/EWG) (1999)
- 236 WACKER-CHEMIE GMBH, EU-Sicherheitsdatenblatt (91/155/EWG) (1994)
- 237 WACKER-CHEMIE GMBH, EU-Sicherheitsdatenblatt (91/155/EWG) (1996)
- 238 WANG, W., SASAKI, H., CHIEN, D.S., LEE, V.H.L., Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Curr. Eye Res.* 10, 571-579 (1991)

- 239 WANG, W., SASAKI, H., CHIEN, D.-S., LEE, V.H.L., Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Curr. Eye Res.* 10, 571-579 (1991)
- 240 WATSKY, M.A., JABLONSKI, M.M., EDELHAUSER, H.F., Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human, *Curr. Eye Res.* 7, 483-486 (1988)
- 241 WENDORFF, A., KEIPERT, S., Optimierte Verfügbarkeit von  $\beta$ -Rezeptorenblockern aus einem Mikroemulsionssystem zur okularen Anwendung, DPhG Berlin-Brandenburg (1999)
- 242 WHEELER, L.A., The use of inclusion complexes of prostaglandins with cyclodextrins in the treatment of ocular hypertension, Eur. Pat. No. 0435 682 A3 (1991)
- 243 WIESEND, B., Die Bestimmung von Pilocarpin und seinen Zersetzungsprodukten mit einer neuen HPLC-Methode, *Pharm. Ztg.* 1, 44-47 (1988)
- 244 [www.charite.de/avt/klinik/ltx/übersichtimmun.html](http://www.charite.de/avt/klinik/ltx/übersichtimmun.html) (2003)
- 245 [www.glaukom.de/therapie.html](http://www.glaukom.de/therapie.html), Die medikamentöse Glaukomtherapie im Überblick (2003)
- 246 YAMADA, Y., TAKAYANAGI, R., TSUCHIYA, K., ITO, K., OHTANI, H., SAWADA, Y., IGA, T., Assessment of systemic adverse reactions induced by ophthalmic  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists, *J. Ocular Pharm. Ther.* 17, 235-248 (2001)
- 247 ZADOK, D., GEYER, O., ZADOK, J., LAZAR, M., KRAKOWSKI, D., NEMET, P., Combined timolol and pilocarpine vs pilocarpine and timolol alone in the treatment of glaucoma, *Am. J. Ophthalmol.* 6, 728-731 (1994)
- 248 ZAKI, I., FITZGERALD, P., HARDY, J.G., WILSON, C.G., A comparison of the effect of viscosity on the precorneal residence of solutions in rabbit and man, *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 463-466 (1986)
- 249 ZIERHUT, M., STÜBINGER, N., ABOALCHAMAT, W., LANDENBERGER, H., BIALASIEWICZ, A.A., ENGELMANN, K., Immunsuppressive Therapie mit Mycophenolatmofetil (Cellcept®) in der Behandlung der Uveitis, *Ophthalmologe* 98, 647-651 (2001)
- 250 ZIMMERMANN, T.J., Topical ophthalmic beta blockers: a comparative review, *J. Ocular Pharm. Therap.* 9, 373-384 (1993)
- 251 ZINK, C. (Hrsg.), Pschyrembel/ Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin, 255., völlig überarbeitete und stark erweiterte Auflage (1986)
- 252 ZURDEL, J., ABOALCHAMAT, B., ZIERHUT, M., STUBIGER, N., BIALASIEWICZ, A., ENGELMANN, K., Early clinical results with mycophenolate mofetil in immunosuppressive therapy of ocular pemphigoid, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 98, 222-228 (2001)

## PUBLIKATIONEN

### PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN:

**KNAPP, S.,** KEIPERT, S., Interactions between cyclodextrins and antiglaucoma agents and their influence on the transcorneal permeability in vitro, Cyclodextrin: From Basic Research to Market, International Cyclodextrin Symposium, 10<sup>th</sup>, Ann Arbor, MI, United States, May 21-24<sup>th</sup>, 2000. Publisher: Wacker Biochem Corp., Adrian, Mich, 399-406 (2000)

**KNAPP, S.,** BERTELMANN, E., HARTMANN, C., KEIPERT, S., PLEYER, U., Intraocular availability of topically applied mycophenolate mofetil in rabbits, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, Apr. 19 (2), 181-92 (2003)

BERTELMANN, E., **KNAPP, S.,** RIECK, P., KEIPERT, S., HARTMANN, C., PLEYER, U., Transkornealer – parakornealer Penetrationsweg für lokal applizierte Pharmaka am Auge – Mycophenolat Mofetil als Modellsubstanz, *Ophthalmologe* Sept. 100 (9), 696-701 (2003)

PLEYER, U., YANG, J., **KNAPP, S.,** SCHÄCKE, H., SCHMEES, N., ORLIC, N., OTASEVIC, L., DE RUIJTER, M., RITTER, T., KEIPERT, S., Effects of a selective steroid receptor agonist (SEGRA) on experimental keratoplasty, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, Im Druck (2004)

### KONGRESSBEITRÄGE:

**KNAPP, S.,** KEIPERT, S.,  $\alpha$ -Cyclodextrin and hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin as vehicles in eye-drop formulations: in vitro permeability studies with mepindolol sulfate, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333, *Suppl.1*, 19 (2000)

**KNAPP, S.,** KEIPERT, S., Interactions between cyclodextrins and antiglaucoma agents and their influence on the transcorneal permeability in vitro, 10th International Cyclodextrin Symposium, Ann Arbor, Michigan, USA (2000)

**KNAPP, S.,** KEIPERT, S., The effect of cyclodextrins on the transcorneal permeability in vitro: pilocarpine in combination with mepindolol sulfate, DPhG Tagung Berlin-Brandenburg, Berlin (2000)

**KNAPP, S.,** BERTELMANN, E., KEIPERT, S., PLEYER, U., Topical application of mycophenolate mofetil: an aqueous eye drop formulation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, 4th International Symposium on Ocular Pharmacology and Pharmaceutics, Sevilla, Spanien (2002)

**KNAPP, S.**, BERTELMANN, E., PLEYER, U., KEIPERT, S., In vivo ocular distribution of a mycophenolate mofetil/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin eye drop formulation, Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence, 8/11 April (2002)

BERTELMANN, E., **KNAPP, S.**, KEIPERT, S., HARTMANN, C., PLEYER U., Intraocular availability of mycophenolate mofetil after topical application in different galenic preparations in a rabbit model, ARVO Abstracts: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2002)

PORSTMANN, A., DE RUIJTER, M., SEDLÁKOVÁ, K., **KNAPP, S.**, VOGT, K., PLEYER, U., Effects of topically applied mycophenolate mofetil on endotoxin-induced uveitis (EIU), EVER (European Association for Vision and Eye Research) Abstract 3375, Alicante, Spanien (2002)

**KNAPP, S.**, BERTELMANN, E., PLEYER, U., KEIPERT, S., Mycophenolic acid and its prodrug mycophenolate mofetil topically applied to the eye, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 335, *Suppl. 1*, 114 (2002)

BERTELMANN, E., **KNAPP, S.**, PLEYER, U., HARTMANN, CHR., Topische Applikation von Mycophenolatmofetil: intraokuläre Verfügbarkeit verschiedener galenischer Präparationen, 100. Jahrestagung der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft), Berlin (2002)

PLEYER, U., YANG, J., **KNAPP, S.**, SCHÄCKE, H., SCHMEES, N., ORLIC, N., OTASEVIC, L., DE RUIJTER, M., RITTER, T., Selektiver Steroid-Rezeptor-Agonist: Ein effektiver Immunmodulator bei Keratoplastik, 101. Jahrestagung der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft), Berlin (2003)

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Berlin, den 30.06.04

Sigrid Knapp-Ulrich